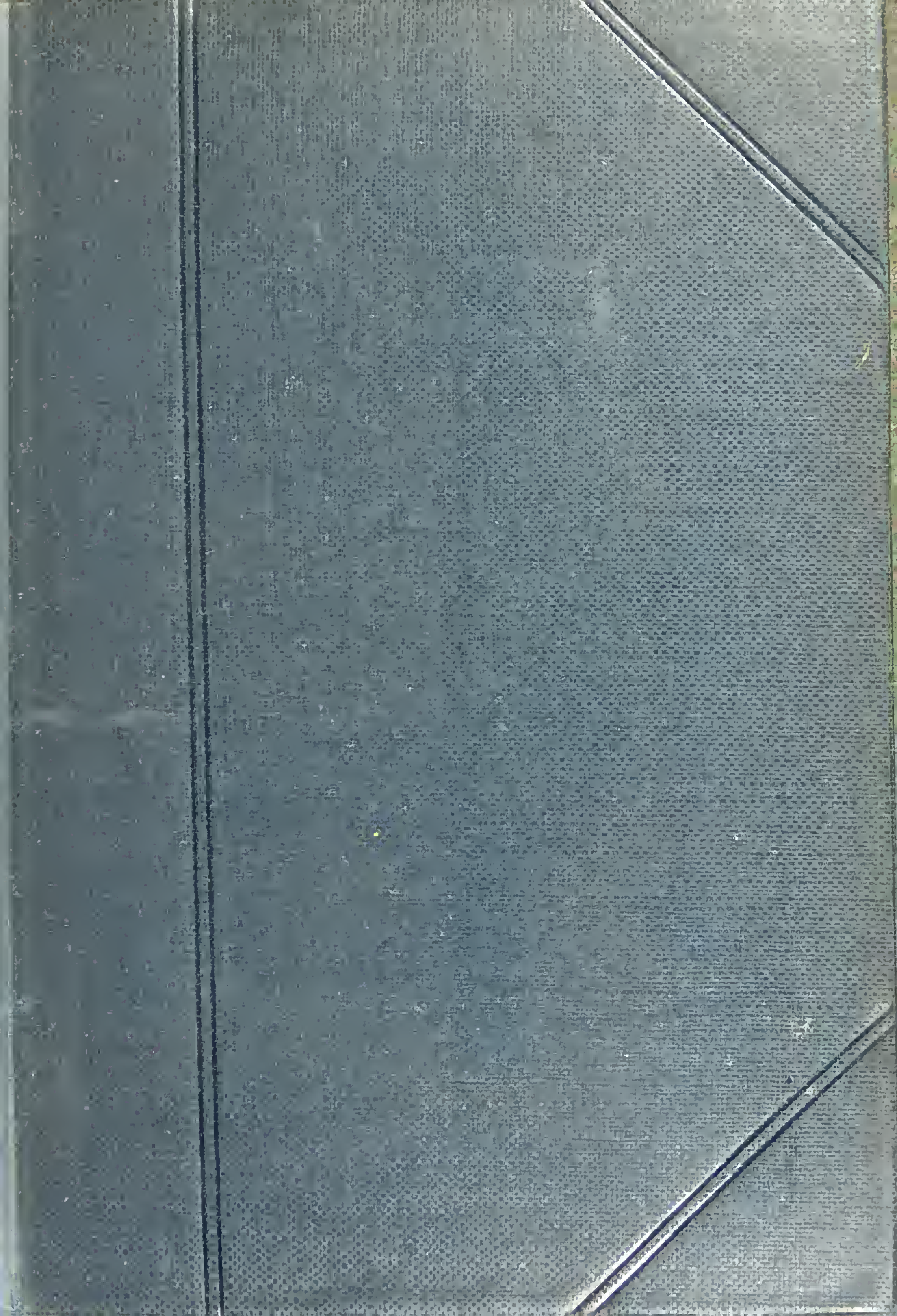


NOUVEAU GUIDE PRATIQUE

DE

TECHNIQUE MICROSCOPIQUE

APPLIQUÉE A

L'HISTOLOGIE ET A L'EMBRYOGÉNIE

DU MÊME AUTEUR

Nouveaux éléments d'Histologie normale à l'usage des étudiants en médecine. — Deuxième édition revue et considérablement augmentée. 1 vol. in-8°, 1888, avec 127 fig. dans le texte.. 6 fr.

HAVRE. — IMPRIMERIE DU COMMERCE, 3, RUE DE LA BOURSE

NOUVEAU GUIDE PRATIQUE

DE

TECHNIQUE MICROSCOPIQUE

APPLIQUÉE A

L'HISTOLOGIE ET A L'EMBRYOGÉNIE

SUIVI D'UN FORMULAIRE

INDIQUANT LA COMPOSITION DES

RÉACTIFS EMPLOYÉS EN ANATOMIE MICROSCOPIQUE

PAR

René BONEVAL



Avec 21 Figures dans le texte.

PARIS

A. MALOINE, LIBRAIRE-ÉDITEUR

91, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 91

Près la Faculté de Médecine

1890

NOUVEAU GUIDE PRATIQUE

DE

TECHNIQUE MICROSCOPIQUE

PREMIÈRE PARTIE

INSTRUMENTS

CHAPITRE PREMIER

LE MICROSCOPE

On donne le nom de microscope (μὶκρος petit, σκοπεὶν regarder) à des instruments d'optique, servant à faciliter la vision d'objets très petits. C'est dans la deuxième moitié du XIII[e] siècle que Bacon décrivit la loupe, que l'on utilise journellement, sous le nom de *microscope simple*, pour pratiquer les dissections fines. Plus tard, vers la fin du XVI[e] siècle, le lunetier Zacharias Jansen, de Middlebourg (1), inventa un appareil plus complexe, donnant des grossissements plus considérables, qu'on désigne sous le nom de *microscope composé*, ou plus simplement de microscope.

§ 1. — MICROSCOPE SIMPLE

Le microscope simple ou à dissection est d'une grande utilité pour l'histologiste : il permet d'effectuer certaines dissections délicates, et, dans bon nombre de cas, de mener à bonne fin des dissociations, qu'il serait impossible de pratiquer à l'œil nu. Réduit à sa plus simple

(1) Certains auteurs attribuent l'invention du microscope composé à Leuwenhoeck.

expression, il consiste en une lentille convexe, montée sur une tige de laiton ; mais dans cet état rudimentaire, il possède des inconvénients mécaniques considérables, et de plus, il fournit des images manquant de netteté. Les défauts de l'image virtuelle, fournie par la loupe, sont dus, en grande partie, au défaut d'achromatisme et à l'aberration de sphéricité. Sans entrer dans des détails d'optique que ne comporte pas le cadre de notre livre, nous devons indiquer rapidement ce que l'on entend par ces termes.

L'aberration chromatique ou de réfrangibilité, produit des images manquant de netteté, et présentant sur leurs bords des irisations de diverses couleurs. Voici en quelques mots l'explication de ce phénomène : un rayon de lumière blanche, en traversant une lentille, se trouve dans les mêmes conditions que s'il traversait un prisme dont les faces seraient tangentes à la lentille, aux points d'incidence et d'émergence. Ce rayon est donc en même temps dévié et décomposé. Considérons, par exemple, un faisceau de lumière blanche, tombant sur une lentille convergente AA, de faible ouverture, parallèlement à l'axe principal BB. Les rayons rouges, qui sont les moins réfrangibles, iront couper l'axe principal, en un point *r* ; les rayons violets, qui sont les plus réfrangibles, couperont ce même

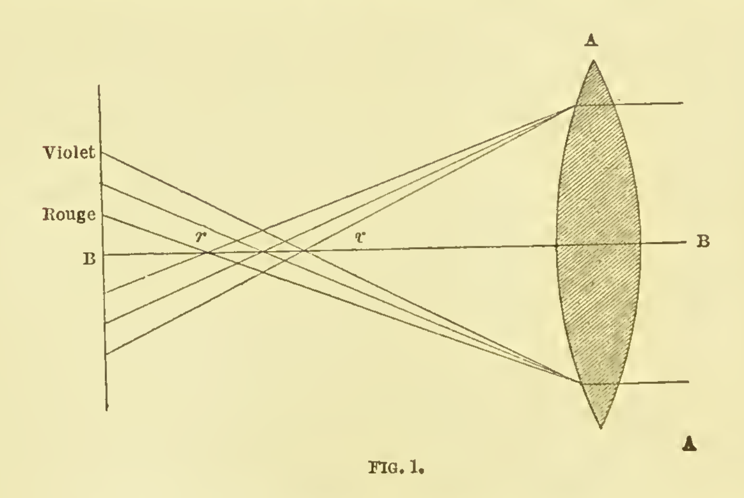


FIG. 1.

axe en un point *v*, plus voisin de la lentille ; les foyers principaux des autres rayons seront situés entre les points *v* et *r*. Dès lors, il est facile de voir que, quel que soit le point où l'on place un écran,

perpendiculairement à l'axe principal, il est impossible que la région éclairée présente de la lumière blanche dans tous ses points. Le défaut d'achromatisme tient donc à l'inégale réfrangibilité des rayons du spectre. Pour corriger l'aberration de réfrangibilité, ou tout au moins l'atténuer, on achromatise les lentilles. Une lentille achromatique est formée par la juxtaposition de deux ou plusieurs lentilles, formées de substances inégalement réfringentes, et habituellement soudées entre elles avec du baume du Canada. Si l'on assemble deux lentilles, l'une convergente et l'autre divergente, dont la première soit en crown-glass, substance peu dispersive, et la seconde en flint, substance très dispersive (1) et si l'on donne à ces lentilles des courbures convenables, on conçoit que l'on obtienne un système fonctionnant comme une lentille convergente unique, mais dans lequel les effets dispersifs seront neutralisés, ou au moins atténués. Les images fournies par une pareille lentille seront plus nettes, et ne présenteront pas d'irisations. C'est là une lentille *achromatique*.

L'**aberration de sphéricité** consiste dans le défaut de convergence au foyer principal des rayons qui émergent près des bords d'une lentille. Ces rayons, plus fortement refractés, viennent rencontrer l'axe principal en un point, d'autant plus voisin de la lentille que l'incidence a lieu plus près des bords. Dans ces cas, les images paraissent entourées d'une auréole. Pour corriger les effets de cette aberration on emploie deux procédés : d'une part on associe deux lentilles à faible courbure dont l'ensemble se comporte comme une lentille unique, mais à courbure beaucoup plus forte, les lentilles ainsi combinées portent le nom de *doublets* ; d'autre part on cache le bord des lentilles au moyen de *diaphragmes*.

Nous n'insisterons pas d'avantage sur ces questions arides d'optique et nous passerons rapidement à la description de quelques microscopes simples.

La *loupe de Brücke*, montée sur un pied articulé, constitue un excellent appareil pour disséquer. Cette loupe est formée d'un objectif achromatique et d'un oculaire. On peut faire varier le grossissement en faisant varier la distance qui sépare les lentilles. Nachet fabrique une excellente loupe de Brücke ; son prix peu élevé la fera choisir de préférence à celles des autres fabricants.

(1) Le crown est un verre formé de silicate de potasse et de chaux ; le flint est à base de potasse et de plomb.

A la place de la loupe de Brücke on pourra prendre un des nombreux modèles de microscopes à dissection qu'on trouve chez tous les constructeurs. Nous ne croyons pas qu'il soit utile de les décrire, il suffira de se procurer les prix courants : de Nachet, de Vérick, de Leitz et de Zeiss, etc., pour avoir une grande variété de dessins qui montrera, mieux que nous ne saurions le faire, les nombreuses modifications apportées dans la fabrication du microscope simple.

§ 2. — MICROSCOPE COMPOSÉ

Le microscope composé dérive directement de la loupe. Réduit à sa plus simple expression, il est représenté par deux lentilles convergentes : l'une a court foyer qui porte le nom d'*objectif*, donne une image réelle renversée et grossie placée au delà et très près du foyer principal ; l'autre, à foyer plus long, l'*oculaire*, placée de telle sorte que l'image fournie par l'objectif vienne se former entre elle et son foyer principal. L'oculaire fonctionne donc comme la loupe, mais, tandis qu'avec la loupe nous examinons directement l'objet, avec l'oculaire du microscope composé nous examinons l'image grossie de l'objet fournie par l'objectif. On décrit généralement dans le microscope composé des parties mécaniques et des parties optiques.

1. **Parties mécaniques**. — Les parties mécaniques constituent le support *statif* des constructeurs allemands. Elles comprennent le pied, la platine, le miroir, le tube, la vis micrométrique.

Le *pied* présente des formes extrêmement variables, il doit satisfaire à une condition essentielle : il doit être large et lourd de façon à assurer à l'instrument une grande stabilité. C'est lui qui supporte toutes les autres parties mécaniques du microscope.

Le *tube* se présente sous la forme d'un cylindre de laiton terminé inférieurement par une pièce conique sur laquelle on visse l'objectif et largement ouvert en haut pour recevoir l'oculaire. Il est habituellement formé de deux cylindres glissant l'un dans l'autre, le supérieur rentrant dans l'inférieur, de telle sorte qu'on peut augmenter en le rentrant ou en le tirant, la distance qui sépare l'oculaire de l'objectif. Au plus grand écartement correspond le plus fort grossissement, aussi il faut dire dans l'évaluation d'un grossissement si le tube oculaire est *tiré* ou *abaissé*.

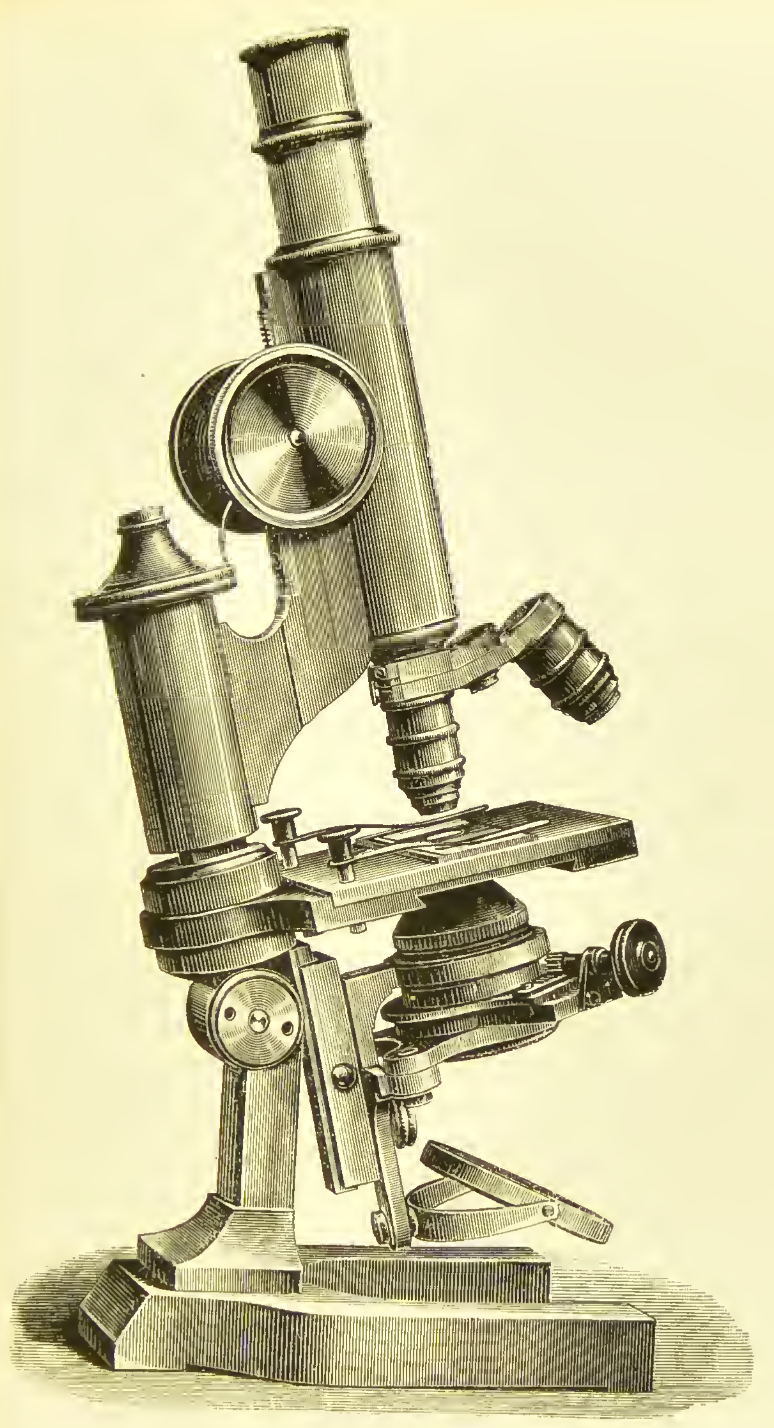


Fig. 2. — Microscope grand modèle Leitz.

L'intérieur du tube est coloré en noir pour empêcher la réflexion de la lumière et présente, à sa partie inférieure, un diaphragme destiné à arrêter les rayons qui divergent trop au-dessus de l'objectif. Le tube du microscope est reçu dans une douille où il glisse à frottement doux. En descendant et en relevant le tube dans cette douille on opère les premières manœuvres de la mise au point. C'est ce qu'on appelle le *mouvement prompt*. Certains instruments possèdent à la place de ce mouvement de glissement, une crémaillère appliquée sur le tube et commandée par une roue dentée. En tournant la double virole fixée aux deux extrémités du pivot de la roue on abaisse et on élève rapidement le tube du microscope. Cette modification qui élève notablement le prix du statif ne présente que de légers avantages (1). La douille porte-tube est reliée par une branche horizontale à une colonne verticale, creuse, dans laquelle pénètre un prisme triangulaire faisant corps avec le pied du microscope. Cette colonne glisse, à frottement doux, sur le prisme ; ce mouvement est réglé par une vis désignée sous le nom de vis micrométrique.

C'est en faisant tourner cette vis dans un sens ou dans l'autre, qu'on achève la mise au point. Le mouvement ainsi produit est extrêmement *doux et lent;* il est indispensable lorsqu'on fait usage d'objectifs puissants.

La *platine* est une table horizontale sur laquelle sont placées les préparations. Faite de métal, dans un grand nombre de statifs, elle est colorée en noir. Certains constructeurs la recouvrent d'une plaque de verre noir ou d'ébonite ce qui la met à l'abri de l'action des réactifs. Sa partie centrale est percée d'un trou placé dans l'axe optique de l'instrument, destiné à laisser passer les rayons lumineux envoyés par le miroir. Il est important de pouvoir, selon la puissance des objectifs employés, diminuer cette ouverture ; ce résultat est obtenu par l'emploi des *diaphragmes*.

Ceux-ci peuvent être constitués par une plaque tournante percée de trous de différents diamètres ; c'est là une disposition qui présente l'inconvénient de se décentrer facilement ce qui rend bientôt impossible l'emploi des petits diaphragmes. Il vaut mieux faire usage de diaphragmes que l'on introduit dans un cylindre porté par une pièce

(1) Il faut excepter les cas où l'on se sert d'un condensateur. La crémaillère est alors très utile.

glissant sous la platine. Cette modification augmente à peine le prix de l'appareil, et comme on peut placer dans le porte-diaphragme des verres colorés et même un condensateur, on ne doit pas hésiter à acheter ce modèle à *diaphragmes cylindriques*.

Le miroir est destiné à éclairer la préparation placée sur la platine. Il est habituellement double : plan d'un côté, concave de l'autre. Un système d'articulations le rattache au pied de l'appareil et permet de le déplacer dans différentes directions.

2. **Partie optique.** — La partie optique du microscope est essentiellement constituée par l'*oculaire* et par l'*objectif*. Mais il convient de joindre à la description de ces deux systèmes optiques, celle des *condensateurs*.

Objectif. — L'objectif étant de beaucoup la pièce la plus importante et aussi la plus coûteuse du microscope, nous devons donner quelques détails indispensables à connaître pour pratiquer un choix judicieux d'un instrument. Il faut qu'en outre de l'aberration *chromatique* et de *sphéricité* dont nous avons parlé plus haut, les lentilles d'un objectif satisfassent à deux conditions importantes : un *grand angle d'ouverture* et une *distance focale* assez grande, ce qui est en apparence incompatible.

Angle d'ouverture. — On donne le nom d'angle d'ouverture à l'angle formé par les rayons extrêmes émanés d'un objet et recueillis

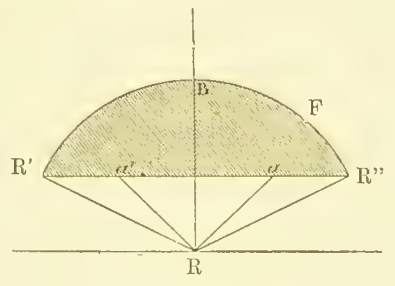


FIG. 3. — Angle d'ouverture.

par la lentille frontale (1). Soit un objet R, la lentille frontale F, et deux rayons extrêmes R'R". L'angle RR'R" représentera l'angle d'ouverture de l'objectif. Or l'expérience et la théorie montrent que

(1) Les objectifs sont habituellement formés de trois lentilles achromatiques. Celle qui est la plus rapprochée de l'objet porte le nom de lentille frontale.

le *pouvoir résolvant* ou séparateur, c'est-à-dire cette propriété, en vertu de laquelle un objectif rend visible les détails les plus minimes, dépend non pas du grossissement mais de la grandeur de l'angle d'ouverture. Le pouvoir résolvant est en raison directe de l'angle d'ouverture. Il est facile de comprendre la raison de ce fait : Plus l'angle d'ouverture d'un objectif est grand, plus la lentille frontale reçoit de rayons émanés de l'objet, de là un éclat plus grand et en outre ce qui est infiniment plus important, les rayons les plus obliques, les plus excentriques sont utilisés et ce sont eux, ainsi qu'il résulte des expériences d'Abbé, qui dessinent les détails les plus fins. Dans bon nombre de cas il sera utile de mesurer l'angle d'ouverture d'un objectif; on peut y arriver de la manière suivante sans l'aide d'aucun instrument. Placer l'instrument sur une table noire. Enlever l'oculaire et descendre le tube jusqu'à ce que la lentille arrive au niveau de la platine. Le miroir étant écarté, placer sur la table deux objets brillants, les écarter successivement jusqu'à ce qu'ils atteignent le bord extrême du champ visible par le tube. L'angle supérieur du triangle formé par les lignes qui réunissent les objets brillants à l'objectif et par la distance qui les sépare indiquera l'angle d'ouverture. Rien de plus facile que de construire ce triangle sur papier.

Au milieu d'une ligne égale à la distance qui sépare les deux corps lumineux on élève une perpendiculaire dont la longueur mesure l'espace AB qui sépare la frontale de la table. On a ainsi la base et la hauteur du triangle cherché. Il suffit de joindre C et C' à B pour avoir les deux côtés et du même coup le triangle CBC' dont l'angle indique l'ouverture angulaire cherchée (fig. 4) (1).

Objectifs à sec et objectifs à immersion. Malgré l'importance considérable d'un grand angle d'ouverture, il est impossible de dépasser une certaine limite et l'on ne construit pas d'objectifs *à sec* dépassant un angle de 170°. On tourne cette difficulté à l'aide de l'*immersion*. Nous ne pouvons faire connaître le principe sur lequel repose l'immersion sans entrer dans des explications d'optique qui dépassent le cadre de notre livre, nous nous contenterons de donner au lecteur les notions les plus indispensables. Entre la lentille frontale d'un objectif et la lamelle qui recouvre une préparation se trouve interposée une couche d'air. Si on remplace cette couche d'air

(1) Robin. Microscope.

par une goutte d'un liquide unissant la frontale à la lamelle on a un objectif à immersion. Ce liquide peut être de l'*eau* (objectifs à immersion à l'eau) ou de l'*huile*. Dans ce dernier cas l'indice de réfraction se rapprochant de celui du verre, on a un objectif à immersion *homo-*

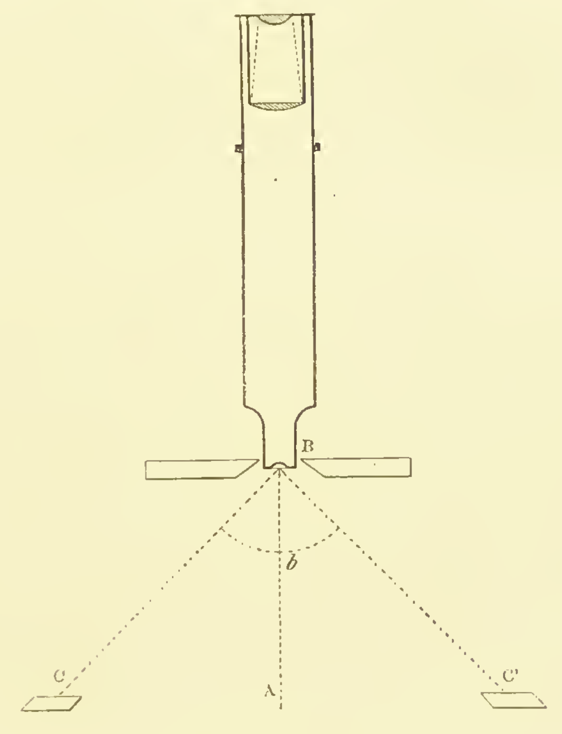


Fig. 4. — Mensuration de l'angle d'ouverture.

gène. L'emploi de l'immersion à l'eau ne présente aucune difficulté : à l'aide d'une baguette de verre on porte sur la lentille frontale une goutte d'eau distillée et on abaisse le tube jusqu'à ce que la goutte soit au contact de la lamelle. Alors on met au point avec la vis micrométrique en regardant dans le tube. Le liquide employé pour l'immersion homogène est habituellement de l'*huile de cèdre ;* il est d'ailleurs fourni par le constructeur en même temps que l'objectif et il vaut mieux en faire usage à l'exclusion de tout autre. Lorsqu'on se sera servi de l'objectif, on enlèvera l'huile avec du papier buvard et on frottera légèrement la lentille au moyen d'un linge fin humecté

de benzine. L'épaisseur des lamelles, si celles-ci ne sont pas convenablement choisies, peut, en faisant dévier plus ou moins les rayons, annihiler les bonnes qualités d'un objectif à sec ou à immersion dans l'eau. On remédie à cet inconvénient soit en prenant des lamelles d'une épaisseur déterminée pour un objectif lorsque sa monture est *fixe* (1), soit en faisant usage d'un objectif à *correction*. La correction est obtenue en modifiant l'écartement des diverses lentilles qui constituent le jeu de l'objectif. Le meilleur système est celui dans lequel la lentille frontale est fixée dans la monture, tandis que les lentilles supérieures sont mobiles. Leur déplacement s'obtient en faisant tourner un anneau qui gouverne l'armature sur laquelle sont fixées les deux lentilles. Pour corriger on fait tourner l'anneau correcteur jusqu'à ce que l'image de l'objet soit bien nette. La correction est inutile pour les objectifs à immersion homogène, la réfraction de la lamelle étant complètement neutralisée, mais elle rend de très grands services appliquée à des objectifs, à sec ou à l'eau, possédant un très fort grossissement.

Les objectifs à sec et à l'eau sont désignés par des numéros. L'objectif est d'autant plus puissant que le numéro est plus fort. Zeiss emploie des lettres au lieu de chiffres. La dénotation des objectifs à immersion homogène se fait en indiquant leur distance focale exprimée en pouces suivant l'usage anglais.

Oculaire. — L'oculaire est formé de deux verres convergents plan convexes fixés aux deux extrémités d'un cylindre qui glisse à frottement doux dans la partie supérieure du tube du microscope. La lentille supérieure porte le nom de verre oculaire, la lentille inférieure est dite verre de champ. La première seule amplifie l'image fournie par l'objetif, la seconde n'ajoute rien au grossissement, mais augmente l'étendue de la partie visible de la préparation. Certains oculaires sont formés de verres achromatiques, ils sont dits oculaires *orthoscopiques*. Ce sont d'excellents oculaires dont l'usage n'est pas assez répandu.

Les constructeurs fournissent des oculaires possédant des pouvoirs amplifiant très divers. Ils sont désignés par des numéros.

Pour pratiquer certaines mensurations on a imaginé de placer dans

(1) Les objectifs de Zeiss à monture fixe portent l'indication de l'épaisseur de la lamelle pour laquelle ils sont corrigés.

l'oculaire une plaque de verre sur laquelle sont tracés des traits indiquant des dixièmes de millimètres. Cette plaque est disposée en un point tel qu'elle se trouve au foyer de la lentille supérieure. Comme cette lentille grossit dix fois, elle montre ces dixièmes de millimètre comme égaux à des millimètres. Nous verrons plus loin l'usage qu'on peut faire du *micromètre oculaire.*

Condensateurs. Éclairage. — Autant que possible on doit faire usage dans les examens microscopiques de la lumière naturelle. On se servira de la lumière réfléchie par un mur blanc ou par les nuages ; jamais on n'emploiera les rayons solaires directs. Pour le travail du soir on peut à la rigueur se servir d'une bonne lampe à pétrole ; mais il existe des lampes qui rendent de véritables services. Lorsqu'on dispose du gaz, une lampe à la *naphtaline* qui donne une flamme plate, entièrement immobile et très blanche, convient tout spécialement. Si l'on ne dispose pas du gaz on prendra la nouvelle lampe de microscope des Drs Koch et Alexandre Wolz. Une lampe à pétrole ordinaire mais basse, supporte outre le verre, une chemise en tôle dont l'extrémité est recourbée à angle-obtus. En un point de cette chemise se trouve adapté un petit tuyau de tôle oblique en bas et en dehors. Pour conduire la lumière sous la préparation, on se sert d'un bâton de verre poli, deux fois recourbé en forme de faucille dont une extrémité est introduite dans celle du petit tuyau cylindrique jusqu'au voisinage du verre de lampe et dont le bout libre est placé sous la préparation. Par suite de la réflexion, la lumière est conduite dans le bâton de verre avec toute son intensité, et elle n'est visible qu'à sa sortie au niveau de l'extrémité libre du bâton de verre. Cette lumière est tranquille, régulière et l'observateur ne reçoit dans l'œil aucune autre lumière, que celle qui est visible dans le tube du microscope. Cette lumière peut être augmentée ou diminuée en rapprochant ou en éloignant de la flamme le bout du bâton de verre conducteur. Dans certains cas la lumière jaune de la lampe peut être compensée par un verre coloré en bleu, on obtient ainsi de la lumière blanche (1).

Dans certaines circonstances, où il y a avantage à se servir de lumière *monochromatique*, on interposera entre la source lumineuse et la préparation un verre coloré en bleu (2). Nous avons dit, en fai-

(1) Cette lampe, construite par Gerhardt, se trouve en dépôt chez M. Cogit.
(2) On pourra placer un verre bleu dans la pièce qui porte les diaphragmes.

sant la description de la partie mécanique du microscope, que le miroir est fixé à une pièce articulée, de telle sorte qu'il peut être placé dans différentes positions. Si l'on dispose le miroir de manière à envoyer les rayons lumineux suivant l'axe de l'appareil, et perpendiculairement à la préparation, on obtient l'éclairage *direct* ou *central*; si, au contraire, on écarte le miroir de l'axe de l'appareil, les rayons lumineux tomberont obliquement sur la préparation en faisant avec l'axe optique un angle plus ou moins grand. L'éclairage *oblique*, ainsi obtenu, permettra dans bien des cas de résoudre certaines structures, qu'il est à peine possible de soupçonner avec l'éclairage direct (1).

L'éclairage produit par le miroir suffit amplement, lorsqu'on fait usage d'objectifs ayant une puissance moyenne ; mais lorsqu'on emploie des systèmes à grande ouverture, et en particulier les objectifs à immersion, il est nécessaire de se servir d'un condensateur.

Tout condensateur est formé d'un système de lentilles, placé sous la platine, à travers lequel sont réfractés les rayons lumineux réfléchis par le miroir et envoyés sur l'objet. Lorsque l'on fait usage du miroir sans condensateur, l'objet reçoit un faisceau de rayons à peu près parallèles. Avec le condensateur, les rayons envoyés par le miroir sur les lentilles du condensateur, sont réfractés de façon à se rencontrer en un point (le foyer du système) ; or, *ce point se trouve situé à l'endroit de l'objet examiné.* La préparation reçoit ainsi un cône lumineux dont le sommet coïncide avec elle ; de là, une lumière plus vive et plus utile. Ainsi que l'a montré Koch (2), les contours des parties non colorées de la préparation deviennent invisibles, ils sont presque fusionnés ; au contraire, les parties colorées ressortent d'autant mieux qu'elles étaient masquées par les contours des parties non colorées. Le condensateur est donc indispensable pour l'étude des micro-organismes ; mais pour être utile, il doit avoir un angle d'ouverture supérieur ou égal à celui de l'objectif employé.

Le condensateur le plus simple est constitué par une lentille plan convexe que l'on met dans la pièce porte-diaphragme, à la place de ce dernier. Ce condensateur ne sert que pour les grossissements moyens. Le travailleur qui fait usage de l'immersion homogène, doit acheter

(1) Pour se servir de l'éclairage oblique, on enlèvera tous les diaphragmes.

(2) R. Koch. *Untersuchungen für Aetiologie der Wundenfections krankeiten.* Leipzig, 1878.

un condensateur plus puissant ; or, l'appareil répondant aux besoins les plus divers, est, à notre avis, le condensateur Abbé.

Ce condensateur est formé d'un système de trois lentilles, à grande ouverture (120° à 140°). La lentille supérieure est une demi-sphère, l'inférieure est bi-convexe, et la lentille du milieu est concavo-convexe. Ces lentilles sont achromatisées.

Au-dessous de ces lentilles se trouve un porte-diaphragme. Les constructeurs remplacent aujourd'hui les diaphragmes cylindriques, autrefois en usage, par le *diaphragme Iris* qui possède une ouverture susceptible de varier lorsqu'on imprime à un bouton un mouvement plus ou moins étendu.

Les constructeurs adaptent les condensateurs au microscope suivant des mécanismes très variés, nous ne les décrirons pas, qu'il nous suffise de savoir que pour la commodité de l'observation le système optique est susceptible de mouvements dans le sens horizontal et dans le sens vertical. En outre, le porte-diaphragme peut être déplacé au moyen d'une crémaillère et être amené en dehors de l'axe optique de l'instrument, ce qui permet de réaliser l'éclairage oblique et l'éclairage direct. Pour résoudre les fines structures on emploiera un très petit diaphragme (1) et si l'on se sert de l'immersion on aura soin de réunir la lentille supérieure du condensateur à la lame par l'intermédiaire d'une goutte d'eau ou d'huile suivant le cas.

Nous devons terminer ce long et peu intéressant chapitre sur le microscope par quelques conseils sur le choix d'un instrument.

1. On achètera un pied moyen modèle, avec ou sans crémaillère, mais qui dans tous les cas, soit susceptible de recevoir le condensateur Abbé. On prendra le statif V^a de Zeiss ; le grand microscope n° I^a de Leitz ; le n° 8 de Nachet ; le modèle n° 4 de Vérick. Le pied dont nous donnons plus loin la figure est un modèle excellent construit par Dumaige. Il est muni d'un condensateur Abbé heureusement modifié par ce constructeur. Comme il porte la vis universelle on peut y visser les objectifs des différents constructeurs. Nous conseillons de le choisir de préférence si l'on veut avoir un excellent statif pour peu d'argent.

2. On achètera les *objectifs* chez des constructeurs connus et on

(1) Pour les préparations de microbes on emploiera au contraire de grands diaphragmes ou même on les supprimera tout à fait.

les fera *choisir* par une personne compétente (1). Voici quels sont les systèmes que nous conseillons :

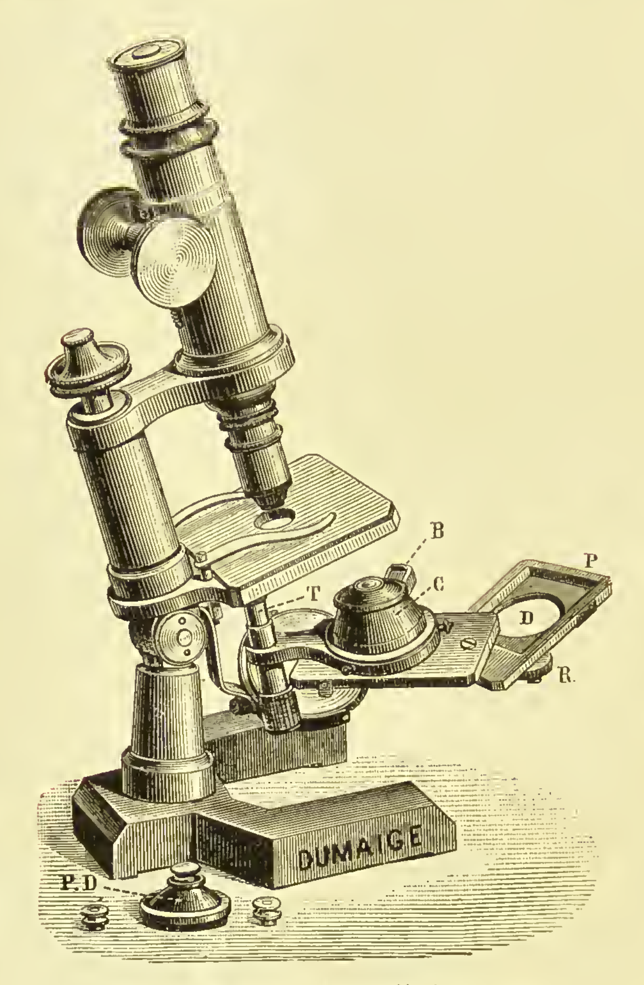


FIG. 5. — Microscope grand modèle de DUMAIGE.

Zeiss : A*, B, C, D à sec, J à immersion dans l'eau et si l'on étudie les bactéries, $\frac{1}{12}$ ou $\frac{1}{18}$ à immersion homogène.

Leitz : nos 1, 3, 5, 8 à sec, $\frac{1}{16}$ ou $\frac{1}{20}$ immersion homogène.

Nachet : nos 2, 3, 5, 8 à sec.

Vérick : nos 0, 2, 4, 6, 8 à sec.

Nous conseillons de prendre les objectifs chez Zeiss ou chez Leitz. Nous n'avons pas besoin de faire l'éloge des objectifs de Zeiss ; ceux de Leitz sont excellents et d'un prix relativement peu élevé. Si nous ajoutons que ce dernier a un dépôt chez M. Cogit et que, par suite, il est possible de choisir soi-même un système optique convenable, nous aurons fait valoir les raisons qui engagent le débutant à se munir des objectifs de ce constructeur.

3. On peut prendre l'oculaire chez le constructeur qui a fourni le statif, mais dans ce cas on choisira un oculaire faible, le nº 1 par exemple. Nous conseillons en outre d'acheter un oculaire fort. On prendra l'*oculaire orthoscopique* nº 4 de Zeiss. Cet oculaire est d'un prix relativement élevé (18 fr. 75), mais on sera largement récompensé par les résultats obtenus.

CHAPITRE DEUXIÈME

ANNEXES DU MICROSCOPE

Nous ne décrirons pas ici tous les instruments annexes du microscope. Certains d'entre eux ayant un usage spécial seront étudiés avec plus de profit dans le cours de cet ouvrage. Nous nous limiterons à ceux dont la connaissance est indispensable (1).

§ 1. — CHAMBRE CLAIRE

La chambre claire est un appareil permettant de prendre un croquis des préparations microscopiques. Il en existe un nombre considérable de modèles ; on choisira un système qui n'altère pas la forme des images et on s'habituera à son instrument. C'est l'appareil auquel on est habitué qui est le meilleur.

Chambre d'Oberhauser. — La chambre d'Oberhauser est formée d'un tube horizontal uni à l'oculaire par un tube vertical plus court. Au point de réunion de ces deux branches dans l'axe optique du microscope, se trouve un prisme à réflexion totale. Un second prisme plus petit est placé à l'extrémité libre du tube horizontal. Les rayons fournis par le microscope, se réfléchissent sur la surface du grand prisme et sont envoyés dans le tube horizontal. A l'extrémité de celui-ci ils rencontrent le petit prisme, se réfléchissent de nouveau, et sont ramenés dans la verticale. Cette disposition permet à l'œil de l'observateur, placé au-dessus du petit prisme, de recueillir les rayons venus d'une feuille de papier placée au-dessous en même temps que ceux de l'image microscopique. Pour se servir de cette chambre on met au point la

(1) C'est pour ce motif que nous ne parlons pas du Test-objet (diatomées ou autres), qui ne sert qu'à tromper les commençants.

préparation à dessiner puis on enlève l'oculaire et on glisse à sa place le tube vertical de la chambre. Une vis de pression permet d'assurer la stabilité de la chambre. On tourne ensuite la vis micrométrique jusqu'à ce que l'image apparaisse et on modère la lumière jusqu'à ce que l'intensité des rayons, fournis par la préparation, soit à peu près égale à celle des rayons réfléchis par le papier. Cet appareil fournit des images d'une grande netteté même avec les plus forts grossissements. Son seul inconvénient, c'est que la branche verticale étant munie d'un oculaire fort, le champ à dessiner est très restreint.

Chambre claire d'Abbé. — Elle est formée de deux prismes triangulaires, unis par leur face hypothénuse qui est argentée, sauf en un point où la couche d'argent manque. Un miroir mobile, porté par une tige qui l'unit à la monture, réfléchit les rayons lumineux émanés du papier. Les rayons fournis par la préparation et par le papier peuvent être recueillis par l'œil de l'observateur. On règle l'intensité de la lumière au moyen de verres colorés que l'on place dans la monture du prisme.

Chambre claire à angle variable du Dr Malassez. — Cette chambre claire est formée de deux prismes : l'un est placé au-dessus de l'oculaire ; l'autre est fixé à une certaine distance en dehors de l'axe du microscope. La modification essentielle apportée par M. Malassez à

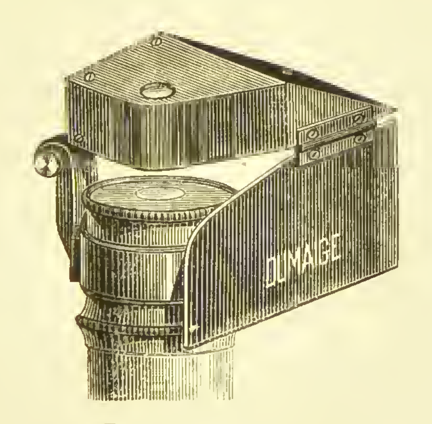


FIG. 6. — Chambre claire.

cette chambre consiste en une disposition permettant de faire varier l'inclinaison du prisme externe. On obtient ce résultat en faisant mouvoir un bouton fixé sur l'axe qui porte le prisme. Avec une inclinai-

son de 18° ou à la chambre claire ordinaire. Elle présente alors le gros inconvénient de contraindre le dessinateur à placer son papier sur un plan incliné sous peine d'avoir des images déformées. A 45° au contraire on peut incliner le microscope et placer la chambre claire de telle sorte que l'image vienne se former en arrière du statif et cela sans déformation aucune.

Les chambres claires, que nous venons de décrire, peuvent être appliquées au *dessin* microscopique et à la *mensuration* des objets.

Le *dessin* à la chambre claire ayant pour but de fixer les contours généraux des objets, ne saurait donner qu'une ébauche. Une fois celle-ci terminée, on écarte la chambre et on ajoute les fins détails en regardant directement dans l'oculaire. Lorsqu'on veut se servir de la chambre, il est nécessaire de régler minutieusement l'éclairage de la préparation et du papier. Celui-ci est-il trop éclairé, l'image de la préparation est à peine visible, alors on diminue l'intensité de l'éclairage du papier en plaçant devant lui un livre dressé sur sa tranche. Au contraire si l'éclairage de la préparation est trop intense, le crayon et la main du dessinateur ne sont plus visibles, on diminue alors la lumière soit au moyen d'un diaphragme, soit en modifiant la position du miroir.

La mensuration des objets microscopiques peut être faite suivant deux méthodes principales : L'une réclame l'emploi combiné de la chambre claire et du micromètre objectif, l'autre emploie simultanément le micromètre oculaire et le micromètre objectif.

1. **Chambre claire et micromètre objectif.** — Le micromètre objectif, que nous n'avons pas encore décrit, est un instrument indispensable pour les mensurations. Il est formé d'une lame de verre sur laquelle on a gravé un millimètre divisé en cent parties égales. Ce micromètre étant mis sur la platine sous l'objectif, on dessine les traits marquant les divisions sur un papier placé au pied du microscope. On obtient ainsi une échelle représentant le centième du micromètre amplifié. Si alors on substitue au micromètre une préparation et qu'on dessine sur un papier le contour de la cellule à mesurer, on peut, à l'aide d'un compas, prendre le diamètre du dessin de la cellule et le reporter sur l'échelle précédemment obtenue. Supposons que le diamètre du dessin de la cellule mesure deux divisions et demie de l'échelle, on dira que la cellule mesure deux centièmes

de millimètre et demi, soit 25 millièmes de millimètre. On est en effet convenu de chiffrer les mensurations microscopiques en millièmes de millimètre et l'on désigne cette unité de mensuration par la lettre grecque μ (micron). La mensuration faite par ce procédé est suffisamment exacte. On peut, en dressant une série d'échelles correspondant aux combinaisons optiques que l'on possède, se servir du micromètre objectif une seule fois, ce qui permet de se dispenser de faire l'achat de cet instrument.

Micromètre oculaire et micromètre objectif. A l'aide du micromètre oculaire (1) et du micromètre objectif on peut mesurer le grossissement d'un objectif et déterminer les dimensions d'un élément anatomique.

Pour mesurer le grossissement placez le micro-objectif sur la platine et regardez à travers le microscope muni du micro-oculaire. Cherchez alors combien de divisions du dernier sont recouvertes par des divisions du second. Pour fixer les idées nous supposons que nous voyons deux divisions du micro-objectif se superposer à quatre divisions du micro-oculaire, cela voudra dire que 4 divisions du micro-oculaire correspondent à 2 du micro-objectif, c'est-à-dire que deux divisions du micro-objectif sont vues grosses comme quatre millimètres, puisque les divisions du micro-oculaire sont vues grâce à la lentille oculaire grosses comme un millimètre. Le grossissement de l'objectif sera donc de 400 fois.

Substituons maintenant au micro-objectif un élément cellulaire une cellule épithéliale par exemple et supposons que cette cellule recouvre 4 divisions du micro-oculaire nous aurons $\frac{2 \times 4}{4 + 100} = 0{,}020$, c'est-dire 20 μ. Pour rendre les calculs plus rapides il suffira d'établir un tableau indiquant la valeur des divisions du micro-oculaire pour chaque objectif que l'on possède. Zeiss a construit une table semblable pour ses objectifs. Pour avoir la dimension d'un objet il n'y a qu'à multiplier le chiffre indiquant la valeur de l'objectif par le nombre des divisions qu'occupe l'image de l'objet. Par un procédé ingénieux le Dr Malassez a encore simplifié cette méthode : le micro-oculaire étant placé dans le microscope on regarde le micro-objectif et on tire doucement le tube rentrant du microscope. On s'arrête dès qu'un certain

(1) Voyez plus haut la description de cet instrument (page 11).

nombre de divisions du micro-oculaire recouvre exactement un nombre entier de divisions du micro-objectif, soit par exemple 10 divisions du micro-oculaire et 30 divisions du micro-objectif. Si 10 divisions du micro-oculaire couvrent 30 divisions, une division en couvrira 10 fois moins soit $\frac{30}{10} = 3$. Nous possédons ainsi la valeur d'une division du micro-oculaire, le tube interne du microscope étant tiré d'une certaine longueur « afin de retrouver le point précis où ces coïncidences ont lieu, je trace un trait sur le tube rentrant du microscope, j'inscris au-dessus de ce trait la valeur de la division du micro-oculaire et je note le n° de l'objectif employé. Cette graduation doit être faite avec les principaux objectifs, afin d'avoir, pour une division du micro-oculaire, un certain nombre de valeurs différentes répondant à tous les besoins de la micrométrie. Dès lors rien de plus simple, que la mesure d'une longeur microscopique.

Prenez un objectif convenable, tirez le tube rentrant jusqu'au niveau du trait correspondant à cet objectif; comptez le nombre de divisions du micro-oculaire comprises dans la longueur cherchée; multipliez le nombre par le chiffre inscrit au-dessus du trait et vous aurez la longueur cherchée ».

2. **Revolver objectif adaptateur.** — Afin d'éviter la perte de temps qui résulte de l'obligation où l'on se trouve de visser et de dévisser les objectifs pour changer de grossissement, on adapte au microscope une pièce tournante qui apporte successivement à l'extrémité du tube l'objectif dont on a besoin.

Ce petit appareil doit être réglé suivant l'objectif dont on doit

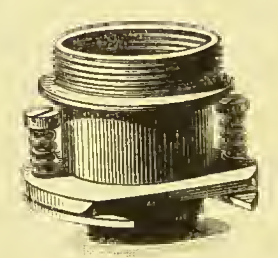


Fig. 7. — Adaptateur.

faire usage, de telle sorte qu'il suffise de quelques mouvements de la vis micrométrique pour compléter la mise au point. On construit un revolver porte-objectif pour deux ou pour trois objectifs.

L'*adaptateur* dont nous donnons la figure ci-jointe remplace avantageusement le revolver. Il se compose d'une pièce que l'on visse une fois pour toutes au microscope et de bagues que l'on adapte à chaque objectif. Le changement de l'objectif est simple et facile. Le centrage est parfait.

§ 2. — INSTRUMENTS EN VERRE

Il est inutile de donner la description des nombreux instruments en verre que l'on peut employer en histologie. Le débutant devra se procurer tout d'abord :

1° Des lames et des lamelles. Il est nécessaire que les lames soient en verre bien transparent et sans défaut. On prend généralement des lames mesurant 76 × 26 millim. Lorsque les lames ont déjà servi on les lavera dans de l'eau renfermant un peu d'acide azotique et on les conservera dans de l'eau alcoolisée contenue dans un cristallisoir fermé d'une lame de verre. Quand on s'est servi de résine Dammar ou de baume on doit les laver dans de l'essence de térébenthine. Les *lamelles* doivent être en verre extrêmement mince, il est même indispensable de posséder des couvre-objets ayant une épaisseur déterminée quand on se sert des forts objectifs à immersion dans l'eau sans correction. Elles seront conservées dans un petit cristallisoir à bords rodés fermé d'un couvercle de verre et rempli d'alcool. On prendra des lamelles carrées de deux dimensions : les unes mesurant par exemple 18 mill. de côté et les autres 23 mill.

2° Des cristallisoirs en verre, à fond plat, de différentes grandeurs.

3° Des verres de montre, en grand nombre.

4° Une éprouvette, ou un verre gradué.

5° Des flacons compte-goutte, pour mettre les réactifs.

6° Des baguettes de verre, des tubes, des entonnoirs de dimensions variées.

7° Des flacons à large ouverture, de 30 ou 40 c.c.

8° Des soucoupes en porcelaine.

9° Des pipettes : on peut facilement les construire soi-même, en effilant à la lampe un tube de verre, long de 5 à 6 centim. Du côté non effilé, on adapte un tube en caoutchouc d'égale longueur, que l'on ferme à son extrémité libre, au moyen d'un fil, soit en plaçant dans sa cavité un fragment de baguette de verre.

10° Une ou deux capsules en porcelaine de Bayeux.

11° Une lampe à alcool.

12° Deux flacons à capuchon : dans l'un, on mettra la résine Dammar ; dans l'autre, on placera le ciment pour fermer les préparations.

13° Une *chambre humide*. Ce petit appareil extrêmement utile est formé d'une cloche de verre, renversée sur un plateau, dans lequel on place quelques doubles de papier buvard imbibé d'eau. Les préparations sont placées dans cette chambre, sur une petite étagère de métal, disposée de façon à pouvoir en recevoir un certain nombre. Nous retrouverons bientôt cette chambre, et nous en dirons les usages.

A mesure qu'il avancera dans ses études, l'étudiant sentira lui-même le besoin de bien d'autres appareils de verre, qu'il serait fastidieux de décrire ici. Il trouvera chez M. Cogit, 17 quai St-Michel, une collection remarquable d'instruments microscopiques (nécessaires à réactifs ; boîtes à préparations, bain-marie, godets en verre, etc., etc.). Nous ne saurions trop conseiller aux commençants de demander à M. Gogit son catalogue ; cela nous dispensera d'entrer dans des descriptions aussi longues qu'inutiles, d'autant plus qu'on ne saurait trouver ailleurs un assortiment aussi complet.

§ 3. — APPAREILS EN MÉTAL

On ne saurait trop recommander de tenir les instruments en métal à l'abri de toute altération. Il ne faut pas imiter les histologistes qui se servent d'aiguilles rouillées, de ciseaux qui ne coupent pas, de pinces qui ne mordent pas. Un travail fait avec de mauvais instrument, se ressent toujours de la qualité des outils ; on se procurera donc des instruments de première qualité.

a. — Des aiguilles à dissocier, également utiles pour transporter les coupes sur la lame de verre. On doit toujours polir soigneusement les aiguilles avant de s'en servir. On les passera sur la pierre, puis sur le cuir, et si elles adhèrent encore aux coupes, on les graissera légèrement en les frottant sur les cheveux. Les porte-crochets que l'on trouve dans les merceries peuvent servir de porte-aiguilles à condition de bien nettoyer les aiguilles que l'on y emmanche.

b. — Des ciseaux fins courbes et droits.

c. — Des scalpels de petites dimensions.

d. — Une seringue à injections hypodermiques.

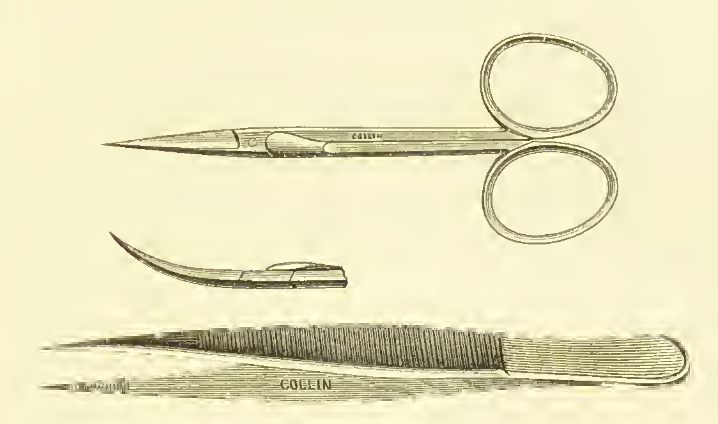


Fig. 8. — Pinces et ciseaux fins.

e. — Une table à chauffer du Dr Malassez (1).

f. — Le trocart emporte-pièce de Duchenne de Boulogne sera utile dans certains cas.

(1) Le rasoir et les microtomes ayant une importance capitale nous les décrirons quand nous traiterons des méthodes employées pour faire les coupes.

DEUXIÈME PARTIE

MÉTHODES GÉNÉRALES

Les tissus et les organes dont on veut déterminer la structure et la texture c'est-à-dire la nature et la disposition des éléments anatomiques constituants, doivent être soumis à une série de méthodes anatomiques que nous allons décrire en indiquant chemin faisant la composition et l'usage des réactifs.

1° Une première méthode permet de débiter les organes en tranches minces susceptibles d'être examinées à la lumière transmise, c'est la *méthode des coupes* que nous plaçons en tête des méthodes générales, parce qu'elle nous permettra de passer en revue presque tous les réactifs.

2° Lorsque les organes présentent une épaisseur peu considérable, nous faisons ici allusion aux objets membraneux, ils peuvent être examinés à plat sur le porte-objet, sans qu'il soit besoin de recourir à la méthode précédente, c'est la méthode d'*extension des membranes* qui présente, comme nous le verrons, une très grande importance.

3° Après avoir pris connaissance de la disposition des cellules, il convient de préciser leur forme et leur structure. On a recours à la méthode des *dissociations* qui permet de séparer les éléments anatomiques primitivement unis les uns aux autres.

4° Enfin nous placerons en dernier lieu, l'*examen des objets vivants*, parce que c'est une méthode délicate, donnant naissance à des erreurs nombreuses et à laquelle on n'aura recours que lorsqu'on se sera familiarisé avec l'observation microscopique.

CHAPITRE PREMIER

MÉTHODE DES COUPES

La méthode des coupes comprend un assez grand nombre de manipulations. L'objet doit être *fixé* et *durci* avant d'être soumis à la *pratique des coupes ;* les tranches obtenues sont ensuite *colorées* et *conservées* dans un liquide approprié.

§ 1. — FIXATION DES TISSUS

La fixation a pour but de tuer les éléments anatomiques, et de coaguler la matière vivante de telle sorte que fixée dans sa forme a l'état de vie, elle puisse sans s'altérer subir l'action des réactifs que l'on fera agir sur elle dans les opérations ultérieures. La fixation doit être faite avec le plus grand soin. Il convient d'observer un certain nombre de règles.

1° Prendre des matériaux *extrêmement frais, vivants*, si c'est possible, sous peine de fixer des altérations cadavériques que l'on serait exposé à décrire comme une structure normale.

Il faut tenir un grand compte de cette règle dans les observations anatomo-pathologiques qui ne peuvent, en général, être faites que 24 heures après la mort et rejeter impitoyablement tout organe présentant un commencement de putréfaction.

2° Ne placer dans les liquides fixateurs que de *très petits fragments*. On les prendra à l'aide d'un rasoir sans les comprimer et en évitant de les laisser sécher. Le volume des pièces variera avec le pouvoir de pénétration du fixateur. C'est ainsi que l'on pourra placer dans l'alcool et dans les bichromates des morceaux plus volumineux que dans l'acide osmique. Si l'on veut obtenir une bonne

fixation on ne devra pas dépasser un centimètre carré avec l'alcool et un millimètre avec l'acide osmique.

3° Faire un choix judicieux du fixateur et l'employer en très *grande quantité*. Tel fixateur qui convient admirablement pour un organe donne des résultats médiocres avec un autre. Lorsque l'on n'est pas fixé par une expérience antérieure on placera séparément des fragments de l'organe dans plusieurs fixateurs, on choisira de préférence l'*alcool*, le *bichromate d'ammoniaque*, l'*acide osmique*. Nous ne saurions trop répéter qu'il convient de prendre une quantité de fixateur équivalente à *quarante ou cinquante fois* le volume de la pièce. Cette règle souffre une seule exception : c'est quand on fait usage de fixateurs *puissants* et d'un prix élevé (acide osmique).

Alcool. — L'alcool est employé à différentes concentrations : l'*alcool au 1/3* de Ranvier que nous retrouverons plus loin comme un excellent réactif dissociateur est également un très bon fixateur. On le prépare en mélangeant un volume d'alcool à 36° Cartier avec deux volumes d'eau distillée.

L'*alcool à 90°* est employé journellement dans les recherches d'anatomie pathologique. Les fragments de tissu ne dépassant pas un centimètre carré y sont maintenus suspendus à l'aide d'un fil. Quand on veut fixer un tissu susceptible de se rétracter, par exemple un fragment de peau, on l'étend au fond d'une soucoupe sèche et tandis qu'on le maintient avec deux aiguilles, on verse dessus de l'alcool à 90°, après quelques instants on abandonne les aiguilles, la peau ne revient plus sur elle-même. Il convient d'observer cette règle, sans quoi on s'exposerait à avoir des pièces déformées et l'on ne pourrait plus savoir dans quelle direction on fait les coupes. Bien que l'on puisse faire de très bonnes préparations avec des pièces ayant séjourné longtemps dans l'alcool, il est préférable de les en retirer au bout de 24 heures à 48 heures.

L'*alcool absolu* sera rarement employé comme réactif fixateur. Lorsqu'on en fera usage, il conviendra de ne point y laisser les pièces plus d'un jour, sans quoi on obtiendrait de mauvaises colorations.

Le débutant devra donc se procurer : de l'*alcool au 1/3* ; de l'*alcool à 90°*, et de l'*alcool absolu*. Ce dernier nous servira dans un grand nombre de manipulations ultérieures, il est d'une utilité incontestable. On le trouve facilement dans le commerce ; il doit être conservé dans un flacon bouché avec du liège. On peut fabriquer soi-même un

alcool suffisamment fort pour les usages courants : prendre un flacon à large goulot, de la contenance de 1 litre, et le remplir aux 3/4 avec de l'alcool fort. Ajouter à l'alcool une certaine quantité de sulfate de cuivre calciné en poudre. Agiter le flacon, et laisser en contact pendant 24 heures. Après quoi, décanter et renouveler l'opération avec une nouvelle quantité de sulfate de cuivre. Dès que le sulfate calciné ne bleuit plus, l'opération est terminée. Pour préparer le sulfate de cuivre calciné, on réduit en poudre du sulfate de cuivre ordinaire, et on le chauffe au rouge sur une plaque de cuivre.

Acide osmique.— C'est le fixateur par excellence. On le trouve chez les droguistes, sous forme de cristaux jaunâtres, enfermés dans des tubes dont la contenance est un demi-gramme. Comme le prix de l'acide osmique est assez élevé, et que la solution est très instable, on doit la préparer avec certaines précautions. Un flacon en verre blanc ou jaune (1) est lavé avec de l'acide sulfurique. On le rince avec de l'eau distillée bien claire, jusqu'à disparition de toute trace d'acide. Le tube contenant de l'acide osmique, bien nettoyé à l'alcool, est cassé d'un trait de lime, et introduit, verre et acide, dans le flacon. On ajoute 50 c. c. d'eau distillée ; c'est d'une solution à 1 pour 0/0 que l'on fait ordinairement usage. Si le nettoyage a été parfait, la solution reste claire (2).

On peut employer l'acide osmique *en vapeurs* ou en *solution.*

C'est la fixation *par* les *vapeurs* qui est le procédé le plus commode et en même temps le plus efficace pour fixer les objets de petites dimensions. Quand il s'agit d'éléments libres, les globules du sang, par exemple, il suffit de renverser le porte-objet sur un flacon à large ouverture, au fond duquel on a versé un peu d'acide osmique. Après quelques minutes, la fixation est parfaite, on peut colorer et monter la préparation. Les objets plus volumineux (ne pas dépasser 1 millim. carré) et les membranes sont fixés avec des épingles sur un bouchon de liège à l'aide duquel on ferme le flacon à large ouverture, contenant 1 c. c. d'acide osmique. La fixation est plus longue ; on doit laisser agir de dix à quinze minutes, et même davantage. Après quoi,

(1) Ce n'est pas la lumière, mais les matières organiques qui réduisent la solution d'acide osmique. Le flacon doit être bouché avec un bouchon de verre.

(2) On évitera de respirer les vapeurs d'acide osmique ; elles occasionnent, chez certaines personnes, une inflammation de la muqueuse pituitaire.

on lave rapidement dans l'eau distillée, on colore ou bien on conserve dans l'alcool pour faire des coupes.

Lorsque l'on met directement les tissus dans la solution à 1 p. 0/0 on doit, nous ne saurions trop le répéter, prendre un fragment de tissu aussi petit que possible (1 millim.) On le place dans un flacon bouché à l'émeri au fond duquel on a versé 2 c. c. de solution. Les tissus y séjournent un temps variable ; pour la grande majorité des cas six heures suffisent. Après quoi on transporte la pièce dans un grand cristallisoir rempli d'eau que l'on renouvelle jusqu'à ce que l'odeur d'osmium ait disparu (10 ou 12 heures) ; on conserve la pièce fixée dans l'alcool à 70°. Si les lavages n'ont pas été exécutés avec soin la pièce continue à noircir dans l'alcool ; c'est là un inconvénient qu'il faut éviter.

Bichromates. — Les bichromates de potasse et d'ammoniaque sont employés avantageusement à la place des solutions d'acide chromique, autrefois en usage. On se sert d'une solution pure de bichromate d'ammoniaque dans l'eau (2 pour 100) ou des mélanges dits liqueur de Muller et liquide d'Erlicki.

Le liquide de Muller ne présente pas de propriétés différentes de celles du bichromate pur ; voici cependant sa formule :

Eau	100
Bichromate de potasse	2
Sulfate de soude	1

Le liquide d'Erlicki fixe mieux et durcit plus vite que les bichromates purs, surtout si on place le liquide fixateur dans une étuve à 37° environ. Il est avantageux pour l'étude du système nerveux central ; en huit jours on obtient une consistance remarquable. Le liquide d'Erlicki est obtenu en remplaçant le sulfate de soude du liquide de Muller par 0 gr. 50 p. 100 de sulfate de cuivre.

Eau	100
Bichromate de potasse	2
Sulfate de cuivre	0 gr. 50

Les solutions de bichromate doivent être employées, d'une manière générale, pour fixer les pièces riches en vaisseaux quand on voudra conserver les globules du sang ; on les emploiera également pour fixer les pièces injectées au bleu de Prusse et toutes les fois qu'on voudra obtenir une bonne coloration nucléaire par l'hématoxyline. Les tissus

devront séjourner dans le sel chromique pendant au moins dix jours (un séjour plus prolongé ne nuit pas), après quoi ils seront minutieusement lavés dans un cristallisoir dont on renouvellera l'eau plusieurs fois pendant 24 heures. Les pièces sont alors prêtes pour l'inclusion.

Acide picrique. — L'acide picrique est employé à l'état de solution aqueuse saturée. On préparera un litre de solution en mettant de l'acide picrique en excès dans un litre d'eau (15 gr. d'acide environ) Au bout de 24 heures la saturation est produite, il faut que le flacon contienne toujours des cristaux d'acide picrique. La solution picrique est un fixateur de premier ordre : on l'emploie avantageusement à la place des bichromates pour l'étude des vaisseaux sanguins. Il est indispensable de ne prendre que des pièces de très *petit volume* (quelques millimètres) et de ne pas les laisser *plus de* 24 *heures* dans la solution. Après quoi les tissus seront placés dans l'alcool fort (1).

Bichlorure de mercure. — Le bichlorure de mercure a été primitivement employé par les zoologistes. Il fixe très bien les tissus, permet de produire ultérieurement d'excellentes colorations, et coûte fort peu d'argent. Ces trois qualités le feront certainement employer par les jeunes histologistes. Pour préparer la solution on fait dissoudre un excès de bichlorure dans l'eau distillée. Pour fixer les tissus, des vertébrés, on emploie la solution froide. Les pièces de très petites dimensions, ne doivent séjourner dans la solution que le temps nécessaire pour la fixation. Lorsque les tissus ont complètement blanchi, ce qui arrive au bout de 5 ou 6 heures, on les transporte dans l'alcool fort que l'on renouvelle plusieurs fois. Il ne faut pas employer d'instrument métallique pour manier les pièces dans la solution de bichlorure. Après un lavage sérieux à l'alcool ces précautions n'ont plus raison d'être.

§ 2. — DURCISSEMENT DES TISSUS

Les réactifs fixateurs que nous venons de passer en revue produisent un durcissement parfois suffisant pour permettre de couper les tissus. Il est possible d'obtenir à main levée des tranches convena-

(1) Nous donnerons plus loin la formule des mélanges fixateurs (Liquide de Fleming, liquide de Kleinemberg, etc.) qui ne servent que pour des cas spéciaux.

bles après l'action de l'alcool, de l'acide osmique, de l'acide picrique, des bichromates, encore faut-il, pour ce qui concerne ces derniers, que l'action ait été prolongée pendant plusieurs mois. Mais une longue expérience est nécessaire et il est plus avantageux de compléter le durcissement. On obtient déjà une circonstance plus ferme en plaçant les tissus fixés dans une certaine quantité d'alcool fort, mais le plus souvent le débutant ne trouvera pas la pièce assez dure, il aura alors recours aux méthodes d'inclusions.

L'inclusion ou l'imbibition des organes par une substance convenable a pour but d'augmenter la consistance des tissus et de fixer les rapports des éléments ou des organes quand il s'agit d'individus très petits (les embryons par exemple). Il existe un nombre considérable de méthodes d'inclusions (1), nous n'exposerons que celles qui nous paraissent avoir une utilité pratique : l'inclusion dans la gomme, l'inclusion dans le collodion, et l'inclusion dans la paraffine.

Inclusion dans la gomme. — La méthode d'inclusion dans la gomme est extrêmement simple, c'est à elle que l'on doit avoir recours dans les travaux courants.

La masse d'inclusion est fournie par une solution de gomme arabique. On en fera une solution assez épaisse dans de l'eau additionnée d'un cristal d'acide phénique qu'on conservera pour l'usage. Quand on voudra faire une inclusion dans la gomme on prendra une petite quantité de cette solution et on l'additionnera d'eau jusqu'à ce qu'elle soit devenue assez claire, c'est ce dernier liquide qui servira pour l'inclusion.

Les tissus fixés par les réactifs précédents seront préparés pour l'inclusion de la manière suivante : les pièces sortant de l'alcool seront placées dans un cristallisoir rempli d'eau, jusqu'à ce qu'elles tombent au fond du vase quand elles sont un peu volumineuses, on les y laisse séjourner un certain temps (30 minutes environ). Ce temps de la manipulation a pour but de chasser l'alcool qui, dans le cas contraire, s'opposerait à la pénétration de la gomme. Les pièces sortant de l'acide osmique, des bichromates, et de l'acide picrique peuvent être employées immédiatement après les lavages indiqués.

On se trouve donc en possession d'une pièce bien imbibée d'eau, quel que soit le fixateur dont on ait fait usage. On la placera dans un vase à large ouverture (une soucoupe convient admirablement) dans lequel on versera de la gomme jusqu'à ce que l'objet soit entièrement

recouvert. Après 24 à 48 heures le tissu sera complètement pénétré. Nous devons insister sur l'usage d'une solution de gomme très peu épaisse et d'un vase large pour faire l'inclusion : une solution claire pénètre mieux les tissus ; d'autre part elle s'épaissit lentement à mesure que l'eau s'évapore.

La pièce sera épongée avec du papier filtre de façon à enlever la couche de gomme qui est à sa surface, puis placé dans une assez grande quantité d'alcool fort où elle devra séjourner de 24 à 48 heures. On peut suspendre la pièce dans l'alcool avec un fil, mais cela n'est pas indispensable si la quantité d'alcool est suffisante.

Inclusion dans le collodion. — On peut employer le collodion officinal, mais il est préférable de se servir de la celluloïdine que l'on se procure facilement chez les droguistes en tablettes de 40 à 50 gr. (1). Pour la dissoudre on la coupe en petits fragments et on la place dans un mélange, en parties égales, d'alcool absolu et d'éther sulfurique. On devra avoir à sa disposition deux solutions : l'une très claire, l'autre sirupeuse.

La pièce sortant de l'alcool à 90° est placée pendant 24 heures dans l'alcool absolu. Lorsqu'elle est complètement déshydratée on la porte dans de l'alcool absolu additionné de son volume d'éther sulfurique. Après un séjour de quelques heures, d'un jour si la pièce est volumineuse on la place dans la solution liquide de celluloïdine pendant 24 heures puis dans la celluloïdine sirupeuse. Il est difficile d'indiquer d'une manière précise combien il faut d'heures pour que la pénétration par la cellluloïdine sirupeuse soit complète. C'est chose très variable suivant la nature du tissu. Règle générale : il vaut mieux laisser trop que trop peu. On prendra pour moyenne une durée de deux ou trois jours.

La pièce une fois pénétrée, est orientée dans une petite boîte en papier remplie de la solution sirupeuse, on laisse évaporer une certaine quantité d'éther jusqu'à ce qu'il se forme une pellicule à la surface. Il faut que l'évaporation soit très lente, aussi on mettra la petite boîte en papier sous une cloche de verre. On complètera ensuite le durcissement en plongeant la boîte dans de l'*alcool à* 82°. Pour les petits objets on emploiera le *chloroforme* à la place de l'alcool à 82°. On obtiendra ainsi très vite une masse plus consistante qu'avec l'alcool.

(1) On la vend 3 fr. à 3 fr. 50 la tablette.

On obtient une masse transparente dans laquelle on taille un bloc contenant l'objet que l'on conserve dans l'alcool à 82° ou dans le chloroforme jusqu'au moment de faire les coupes.

La transparence parfaite de la celluloïdine permet de ne point éloigner la masse, aussi les rapports des éléments sont-ils admirablement conservés. C'est là, l'avantage capital de ce procédé d'inclusion.

Inclusion dans la paraffine. — Dans cette méthode d'inclusion la masse destinée à infiltrer la pièce est formée par de la paraffine. On trouve dans le commerce des paraffines fusibles à différentes températures. On devra se procurer une paraffine molle fusible à 45° ; une paraffine plus dure fusible à 55° et enfin une paraffine dure fusible de 60 à 65°, et on exigera du marchand un produit bien homogène. A l'aide de ces trois sortes de paraffine on pourra obtenir, en combinant différentes proportions de chacune d'elles, des masses fusibles à une température déterminée.

La pièce sortant de l'alcool à 90° est placée dans l'alcool absolu pendant 24 heures. Lorsqu'elle est complètement déshydratée on verse dans un tube à essai deux centimètres environ d'alcool absolu puis on remplit une petite pipette avec de l'essence de bois de cèdre. Tandis qu'on la ferme à sa partie supérieure avec la pulpe du doigt on en introduit la pointe dans le tube à essai jusque dans les couches profondes de l'alcool et on laisse couler lentement. Il se forme deux couches : l'une supérieure d'alcool absolu, l'autre inférieure d'essence de bois de cèdre. On introduit doucement la pièce qui reste en suspension entre les deux couches. La pénétration s'effectue ainsi avec une extrême lenteur et quelques heures après les liquides s'étant mélangés par diffusion, la pièce tombe au fond du tube. On la transporte alors dans de l'essence de bois de cèdre pure. Ce premier temps de l'opération a pour but de substituer un dissolvant de la paraffine à l'alcool absolu.

Il faut maintenant remplacer graduellement l'essence de bois de cèdre par la paraffine. On trouve chez les marchands d'articles microscopiques, un bain-marie et des étuves destinés à obtenir une température constante, mais ces appareils coûtent fort cher et ne sont pas indispensables. On remplira d'eau une capsule en fer émaillé de la contenance d'un litre et on fera flotter à sa surface une plaque de liège percée de trous de dimensions variables. Une petite lampe à essence ou une veilleuse permettra d'obtenir, après quelques tâtonnements, une

température constante que l'on règlera à l'aide d'un thermomètre plongé dans l'eau. Dans chacun des trous de la plaque de liège on introduit une de ces capsules en plomb dont se servent les liquoristes pour encapsuler les bouteilles et dont on a légèrement retourné les bords pour la maintenir suspendue à la plaque. C'est dans les capsules que nous ferons l'inclusion ; mais, pour l'instant, revenons à notre pièce que nous avons laissée dans l'essence de bois de cèdre. Après 24 heures de séjour dans ce liquide on ajoute à l'essence de petits fragments de paraffine et on chauffe au bain-marie à une température de 35° environ. La pièce doit rester dans ce bain un temps variable : *règle générale*, 5 ou 6 heures pour un objet de 2 millimètres de diamètre. Après ce premier bain le tissu sera transporté dans de la paraffine dure chauffée à 55° dans une des capsules en plomb dont nous avons parlé plus haut. Elle doit séjourner dans ce nouveau bain *cinq ou six heures* si elle est petite, *vingt-quatre heures* et même davantage si elle est tant soit peu volumineuse. Après quoi on oriente la pièce pendant que la paraffine est encore fondue, on enlève la capsule du bain-marie et on refroidit en faisant flotter le tout dans un vase rempli d'eau froide. Il suffit de déchirer la capsule quand la paraffine est devenue solide pour obtenir un bloc dans lequel on taillera un cube contenant la pièce.

La méthode d'inclusion à la paraffine exige (1) des manipulations longues et laborieuses ; elle altère les structures très délicates. On ne devra donc pas l'employer pour le travail courant on la réservera pour les cas où il sera nécessaire d'obtenir des coupes larges et uniformes. Elle rend de grands services quand on l'emploie comme complément de l'inclusion à la celluloïdine. Celle-ci possède l'avantage de maintenir les organes en place mais elle ne donne que des masses peu consistantes. On réunit les avantages du collodion et de la paraffine en les combinant. La pièce infiltrée de collodion et durcie par le *chloroforme* est placée pendant quelques heures dans un mélange de chloroforme et de la paraffine chauffé à 35° C. On la porte ensuite dans de la paraffine dure chauffée à 55° et on opère comme pour l'inclusion dans la paraffine pure.

(1) Nous indiquerons plus loin comment on doit traiter les coupes obtenues par les différentes méthodes d'inclusion.

§ 3. — PRATIQUE DES COUPES

Les tissus, *fixés*, *durcis* et *inclus*, il s'agit de pratiquer des coupes minces présentant une certaine étendue. Il existe un certain nombre de procédés et d'instruments permettant d'arriver sans trop de difficulté à ce résultat. Avant de les décrire, nous devons donner quelques renseignements sur le choix et sur l'entretien du *rasoir*. Cet instrument est le plus important après le microscope, avec un mauvais rasoir il est impossible de faire de bonnes coupes.

Nous conseillons de se procurer un rasoir anglais de J.Weiss. Malgré son prix élevé (10 francs), c'est une véritable économie, car si l'on achète un rasoir chez un coutelier quelconque on éprouvera bientôt le besoin de s'en procurer un plus parfait. Lorsqu'on sera en possession d'un bon instrument, on se gardera bien de le donner à repasser à un constructeur ou à un coutelier. Nous avons fait cette remarque que toutes les fois qu'on met un rasoir entre leurs mains il revient extrêmement brillant, mais *il ne coupe plus*. C'est une chose singulière dont on peut faire facilement l'expérience. Il est aussi important pour un histologiste de bien aiguiser le rasoir que de savoir manier le microscope. On achètera une bonne pierre à grain fin et assez large (1) et un cuir à rasoir. Pour repasser le rasoir on arrosera la pierre avec de l'huile de pieds de bœuf et on aura soin de faire glisser la lame légèrement appliquée sur la pierre en tenant toujours le tranchant en avant. Lorsque la lame sera bien affûtée on la passera plusieurs fois sur le cuir puis on la lavera dans l'alcool pour enlever l'huile qui a servi au repassage. Ces quelques conseils donnés, passons à l'étude des procédés employés pour faire les coupes.

Coupes à main levée.—Cette méthode réclame une certaine expérience manuelle, mais elle est d'une grande simplicité instrumentale, puisqu'elle n'exige qu'un instrument, le rasoir. Voici comment il convient de procéder. Prendre un bâton de moelle de sureau aussi gros que possible dont on enlèvera les couches superficielles imprégnées de silice. Sur une certaine étendue de sa longueur pratiquer une fente parallèlement à son grand axe, à l'aide d'un scalpel

(1) On en trouve à des prix relativement peu élevés chez les marchands de meules et de pierres à aiguiser. C'est la pierre dite du Levant qui convient le mieux.

ou d'une scie. Écarter légèrement les lèvres de la fente et y placer le tissu inclus dans la gomme (1). Grâce à l'élasticité de la moelle la pièce est maintenue fixée dans la fente, on prend alors le bâton de moelle de sureau entre le pouce et l'index de la main gauche et de la main droite on saisit le rasoir. On plonge la lame dans un petit cristallisoir plein d'alcool et tandis quelle est encore couverte de ce liquide on l'engage hardiment dans la pièce que l'on a préalablement avivée (2). C'est ce temps de l'opération qui est le plus délicat. Si l'on n'est pas bien sûr de soi, il est bon d'appuyer légèrement le rasoir sur l'ongle du pouce de la main gauche. Le procédé suivant, indiqué par Ranvier pour l'étude des nerfs, peut rendre l'opération plus facile. La pièce, bien épongée avec du papier filtre, est placée dans une petite cavité creusée dans un bâton de moelle de sureau. On verse alors dans cette cavité un mélange de cire vierge et d'huile, porté à une température qui ne doit pas dépasser son point de fusion.

« Lorsque ce mélange est refroidi une première section ayant régularisé la surface des trois corps qui se trouvent associés (moelle de sureau, mélange de cire et d'huile, pièce), pour pratiquer la seconde section qui doit dégager la coupe, on déprime avec le rasoir la surface de la moelle de sureau de manière à faire saillir d'une quantité aussi petite que possible la cire et la pièce, et on tranche d'un seul coup avec une sûreté de main d'autant plus grande que le rasoir repose sur un plan qui le guide. La moelle de sureau ainsi employée tient lieu de microtome. » Quel que soit le procédé adopté, les coupes flottant sur la couche d'alcool dont est mouillé le rasoir, il suffit de plonger la lame dans un cristallisoir plein d'eau pour qu'elles surnagent immédiatement.

Coupes au microtome Ranvier. — Il faut un assez long apprentissage pour obtenir des coupes convenables quand on emploie la méthode précédente, aussi on a imaginé de nombreux microtomes destinés à rendre la pratique des coupes entièrement mécanique. Le plus simple de ces instruments est celui de Ranvier : « Il est formé d'un *cylindre* creux ayant, à l'une de ses extrémités, un plateau et à son autre bout une vis micrométrique qui fait monter un piston dans l'intérieur du cylindre ». Quand on veut faire des sections fines à

(1) Nous indiquons le procédé de choix pour chaque méthode d'inclusion.

(2) On peut couper soit d'avant en arrière, soit d'arrière en avant, cela n'a pas d'importance.

l'aide de ce microtome, on prend des bâtons de moelle de sureau qu'on pèle minutieusement pour enlever les couches infiltrées de silice et qu'on aplatit ensuite en les comprimant avec les doigts On fait descendre le piston du microtome jusqu'à ce qu'on ait une



FIG. 9. — Microtome mandrin de RANVIER.

longueur de tube suffisante pour y placer le tissu, on cale celui-ci solidement avec des morceaux de moelle comprimée et on renverse le microtome dans un cristallisoir rempli d'alcool.

La moelle en se gonflant achève d'assurer la fixité de la pièce. « La préparation étant disposée dans le microtome, on la fait monter en tournant la vis, de telle sorte qu'elle affleure la plate-forme, puis la dépasse plus ou moins. Après avoir avivé la surface de section en enlevant ce qui dépasse, si on imprime à la vis un cinquième, un quart, un tiers de tour, on peut, alors, avec un rasoir, dont l'une des faces est appliquée exactement sur la plate-forme du microtome, enlever des tranches très minces (1). Comme pour les coupes à main levée il est indispensable que le rasoir et le tissu soient couverts d'alcool. Quand on fait la section on obtient facilement ce résultat en trempant après chaque coupe, le microtome et le rasoir dans une soucoupe pleine de ce liquide. Le microtome de Ranvier est un

(1) DUVAL. Technique microscopique. *Archives de physiologie*, 15 novembre 1884.

instrument précieux que tout étudiant histologiste doit se procurer en même temps que le microscope. Il convient spécialement pour les coupes après inclusion dans la gomme, mais il faut, pour obtenir de bons résultats, que la pièce ait été bien gommée et convenablement durcie.

Coupes au microtome de Malassez. — Le microtome précédent est un instrument d'amateur isolé. Celui dont nous allons parler se trouve dans tous les laboratoires d'anatomie, nous devons donc le décrire minutieusement. Dans ce microtome l'objet est maintenu fixé à l'aide d'une pince-étau particulière ; le rasoir est porté par une pièce mobile à laquelle on imprime à l'aide d'une manivelle un mouvement produisant la section de l'objet et réglant l'épaisseur de la coupe.

Quand on veut se servir de ce microtome on commence par fixer la pièce (1) sur un cylindre de bois. On y arrive facilement en imbibant avec la colle à froid des papetiers une des bases du cylindre sur laquelle on place le tissu préalablement garni de colle sur la face correspondante. Il faut éponger soigneusement la pièce avec du papier buvard avant de la coller sur le cylindre sans quoi la colle coagulée par l'alcool n'adhérerait pas. On place ensuite le tout dans un grand flacon rempli d'alcool à 90° et au bout de 24 heures la pièce est solidement fixée au cylindre de bois, que l'on pince dans l'étau du microtome.

On procède ensuite à l'installation du *rasoir*. Par suite d'une disposition particulière du mors, on peut employer un rasoir quelconque, ce qui permet de procéder soi-même au repassage de la lame toutes les fois que le besoin s'en fait sentir (2). La mobilité de ce mors permet d'éloigner plus ou moins le rasoir de la pièce, de le tourner dans un sens ou dans l'autre de façon à avoir le tranchant transversal ou oblique. Enfin, grâce à la présence d'une pièce métallique en forme de coin, on peut donner au tranchant une inclinaison variable de façon à faire mordre plus ou moins. Nous conseillons de *fixer le rasoir près de son talon et de lui donner une obliquité telle que toute la longueur de la lame soit utilisée dans la section.*

On déplace ensuite le ressort qui commande l'encliquetage et on

(1) Il s'agit d'une pièce durcie par l'action successive de la gomme et de l'alcool.

(2) On emploie, pour couper avec le microtome Jung, des rasoirs spéciaux, dont l'affûtage ne peut être convenablement exécuté que par le constructeur.

renverse ce dernier. Il faut faire tourner la vis micrométrique jusqu'à ce que le tranchant affleure la pièce. Dès que ce résultat est obtenu on remet l'encliquetage dans la situation primitive et on imprime à la manette un mouvement de va-et-vient qui a pour résultat de produire un mouvement de descente. Quand on fait la coupe après avoir fait tourner la roue dentée d'un seul cran, on obtient une tranche de 1/100 de millim. Si la pièce est bien durcie et pas trop large on obtient facilement des sections de cette épaisseur, à *condition toutefois que le mouvement imprimé à la manette soit très rapide.*

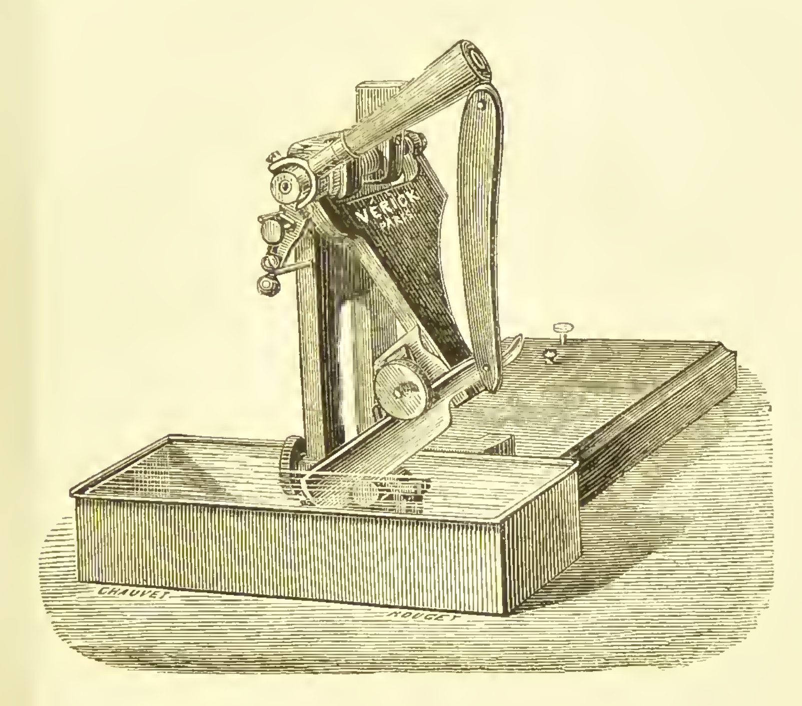


Fig. 10. — Microtome Malassez, disposé pour couper dans l'alcool.

Mais, quand il s'agit de pièces mal durcies il est impossible d'obtenir des coupes comprenant toute la largeur de la pièce, il faut alors se contenter de coupes moins minces. On les obtient en faisant tourner la roue dentée de 2, 3, et même 4 crans. Après avoir fait manœuvrer la manette comme si l'on voulait couper, on s'arrête au moment où le rasoir va entamer le tissu, puis on ramène la pièce porte-rasoir contre le butoir de façon à faire tourner la roue dentée d'un second cran ; la coupe

obtenue est de 1/50e millim. Il est indispensable, pendant toutes ces opérations, d'arroser la pièce et le rasoir avec de l'alcool, ce qui s'obtient facilement à l'aide d'un pinceau que l'on trempe dans de l'alcool fort. Le même pinceau sert à porter les coupes dans l'eau.

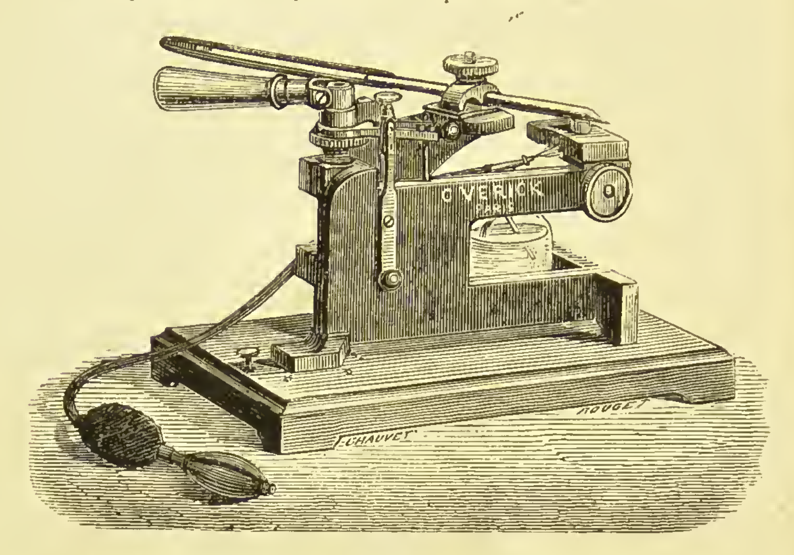


FIG. 11. — Microtome MALASSEZ, disposé pour couper des tissus congelés.

Ce microtome permet en outre de couper dans l'alcool : Si l'on presse sur le bouton qui se trouve à côté de la vis micrométrique on peut renverser le microtome de telle sorte que la pièce et le rasoir plongent dans une cuvette remplie d'alcool. Il faut, pour bien réussir les coupes, faire exécuter au rasoir un mouvement très rapide.

Il est facile d'obtenir, avec ce microtome, des coupes de tissus *congelés*. On remplace la pince porte-objet par la boîte à congélation sur la plaque de laquelle on pose la pièce dans un peu de gomme picriquée (1). La congélation peut être produite à l'aide des vapeurs d'éther, mais il est préférable de se servir de chlorure de méthyle. Après avoir placé le bec du siphon (2) dans le trou de la boîte à congélation

(1) Les tissus frais ne doivent pas être soumis à la congélation. On les soumettra préalablement à la technique suivante : après fixation par l'alcool fort suivie d'un lavage minutieux pour *enlever toutes traces d'alcool* qui empêcherait la congélation, on les place pendant 24 heures dans de la gomme additionnée d'une certaine quantité d'acide picrique en solution dans l'eau.

(2) On trouve le chlorure de méthyle chez les marchands de produits chimiques Cette substance est contenue dans des siphons en cuivre qui coûtent fort cher.

on tourne le robinet et on laisse sortir le chlorure pendant quelques secondes. Les coupes se font avec une facilité extrême, on les recueille dans de l'eau privée d'air par l'ébullition. Si le tissu est trop dur on attend quelques instants avant de couper, s'il est trop mou on projette de nouveau du chlorure de méthyle.

Coupes au microtome à bascule. — C'est avec cet instrument que l'on fera les coupes d'objets inclus dans la paraffine et principalement les coupes en série. Dans cet instrument le rasoir est fixé sur un porte-objet placé à l'extrémité du long bras de levier.

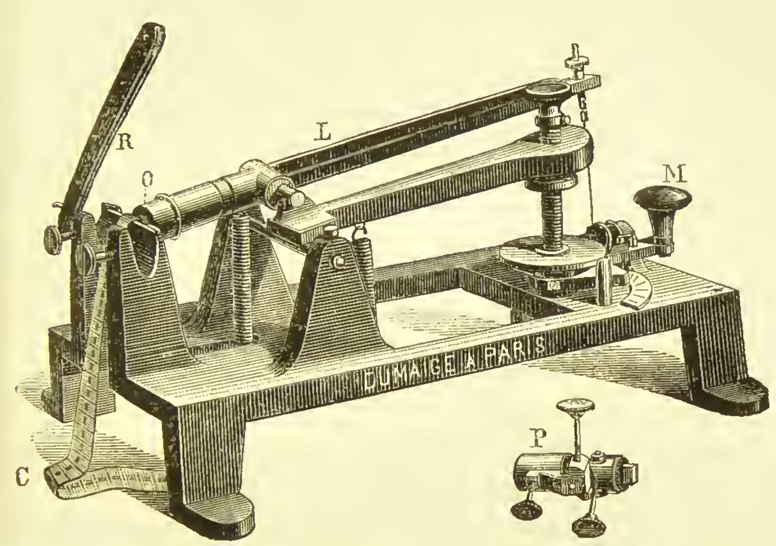


Fig. 12. — Microtome à bascule pour les coupes en série. — M. Manivelle. — L. Levier. R. Rasoir. — O. Porte-objet. — P. Porte-objet à orientation.

Lorsqu'on veut faire des coupes en série, il convient de bien choisir la paraffine dans laquelle l'inclusion doit être faite. Éviter avant tout une paraffine trop dure, « une paraffine ayant son point de fusion à 45° C. est celle qui convient lorsque la température du laboratoire se trouve entre 15° et 17° C. Pour une température de 22° C. il faut une paraffine fondant à 48° C. (1). » On peut d'ailleurs corriger l'excès de dureté de la masse en entourant le bloc contenant l'objet d'une couche mince de paraffine molle, ce qu'on obtient facilement en trempant celui-ci pendant une seconde dans de la paraffine molle fondue. Une autre condition indispensable pour obtenir les coupes en série, c'est de tailler

(1) Henneguy et Bolles Lee.

le bloc, de telle sorte que ses côtés fassent un rectangle ou un carré parfait.

On fixe ce cube de paraffine au porte-objet du microtome par un procédé bien simple. La petite cavité cylindrique du porte-objet a été préalablement remplie de paraffine qu'on a laissée refroidir. C'est sur cette paraffine qu'on fixera l'objet à couper. Avec une tige de fer légèrement chauffée à la lampe on fond la couche superficielle de paraffine sur laquelle on place immédiatement le bloc renfermant l'objet. Il suffit ensuite de toucher légèrement la partie inférieure du bloc pour fondre la paraffine et rendre l'adhérence plus intime. Cela fait, on laisse refroidir puis on fixe le porte-objet sur le long bras du microtome. Il faut alors fixer le rasoir bien transversalement et faire tourner la vis micrométrique jusqu'à ce que la pièce affleure le tranchant. Lorsque ce résultat est atteint il suffit d'imprimer un mouvement de va-et-vient à la manivelle pour obtenir une série de coupes qui se collent les unes aux autres par leur bord et forment de véritables rubans de coupes. Nous dirons, plus loin, comment il convient de traiter ces chaînes pour fixer les coupes sur le porte-objet dans leur situation primitive. On peut, avec le microtome à bascule, obtenir des coupes d'une épaisseur variant de 1/50 à 1/400 de millimètre, il suffit pour cela de modifier la position d'une pièce métallique annexée à la vis micrométrique.

Coupes au microtome Thoma. — Cet instrument permet d'obtenir des coupes d'objets inclus dans la gomme, dans le collodion et dans la paraffine. Il est formé d'un support de chaque côté duquel sont placés deux glissières, celle de droite est horizontale, celle de gauche forme un plan incliné. Sur chacune de ces glissières se trouve un chariot : le chariot, porté par la glissière horizontale, sert à maintenir le rasoir ; le chariot de gauche est muni d'une pince sur laquelle on fixe l'objet. Ce dernier est gouverné par une vis micrométrique qui permet de mesurer l'épaisseur des coupes.

Quand on veut faire des coupes à l'aide du microtome Thoma, il convient de fixer la pièce sur un bloc de bois que l'on place dans la pince porte-objet (1).

Le rasoir doit être minutieusement orienté : il doit être d'autant plus oblique que la pièce est plus molle. Ce n'est qu'avec la paraffine

(1) Le procédé destiné à coller les pièces a été indiqué plus haut.

très dure qu'on emploiera le rasoir transversal ; avec la gomme et le collodion , on l'appliquera de telle façon qu'il commence à couper par son talon. Cette recommandation est extrêmement importante car on applique, le plus souvent, la lame de telle sorte qu'elle commence à toucher la pièce au niveau de son milieu. Il faut couper en glissant et non en poussant, on obtient ce résultat en utilisant la lame dans toute sa longueur. Tandis qu'on fait les coupes il convient d'arroser le rasoir et la pièce avec de l'alcool. On enlève les coupes de la lame avec un pinceau imbibé d'alcool et on les trans-

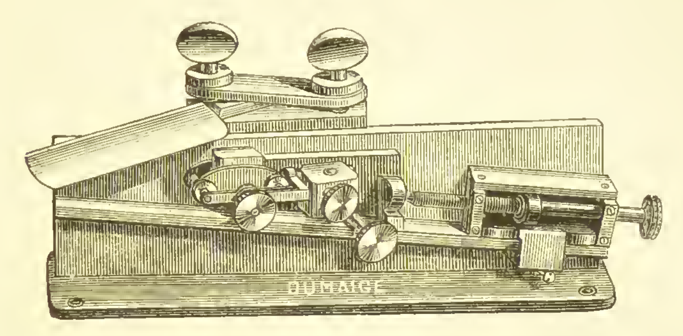


Fig. 13. — Petit microtome, système Thoma, construit par Dumaige.

porte dans un liquide approprié (voir plus loin). Les coupes des objets inclus dans la paraffine se font à sec.

§ 4. — COLORATION

Les coupes, obtenues à l'aide d'une des méthodes précédentes, doivent être préparées pour la coloration d'une manière différente suivant la substance d'inclusion qui a servi à inclure la pièce.

1° Quand l'objet à été sinplement durci par l'*alcool*, par l'*acide picrique*, par les *bichromates*, ou inclus dans le *gomme* on porte directement les coupes dans une cuvette pleine d'eau. On les y abandonne un certain temps, aprés quoi elles sont bonnes à colorer. Lorsque les tissus ont été fixés par l'acide picrique, il faut attendre que la coloration jaune ait disparu, quand la pièce a été infiltrée de gomme, ce n'est que quand cette substance a été complètement écartée qu'on doit faire agir les réactifs colorants

2° Il existe deux méthodes de coloration applicables aux pièces traitées par les procédés d'inclusion à la paraffine et au collodion.

Dans l'une d'elles, la pièce est colorée *en masse* avant de la débiter en coupes et immédiatement après les lavages qui suivent la fixation ; dans l'autre les coupes sont colorées *séparément* sur le porte-objet. Nous aurons à décrire la première quand nous étudierons la technique applicable aux études embryogéniques ; nous nous contenterons d'indiquer ici comment il convient de traiter les coupes *isolées* (1).

Les coupes pratiquées dans des tissus inclus dans le collodion seront reçues dans un bain d'alcool puis montées sur une lame et traitées d'une manière différente suivant que l'on doit faire usage d'un colorant alcoolique ou d'un colorant aqueux. Dans le premier cas on traitera la coupe par une série d'alcools de plus en plus dilués (alcool à 82°, alcool au 1/3) et enfin par l'eau et par le colorant. Dans le second cas on teindra la coupe immédiatement après sa sortie de l'alcool.

Tandis que les *coupes au collodion* doivent être colorées sans éloigner la masse d'inclusion, les *coupes à la paraffine* doivent être soigneusement débarrassées de cette substance avant d'être soumises à la teinture. La coupe est étalée à l'aide d'un pinceau sec sur le porte-objet (2), on ajoute de la benzine jusqu'à ce que toute trace de paraffine ait disparu, on laisse écouler l'excès de benzine et on lui substitue de l'alcool absolu. On procédera ensuite comme pour les coupes au collodion.

Après avoir rapidement indiqué, comment les coupes obtenues par les différentes méthodes d'inclusion, doivent être traitées avant d'être soumises à la coloration, nous allons faire connaître les principaux réactifs colorants (3). On ne doit pas se perdre dans l'emploi d'un grand nombre de teintures il vaut mieux s'appliquer à bien manier quelques-unes d'entre elles que d'en avoir un grand nombre que l'on emploierait mal. L'étudiant histologiste devra tout d'abord se procurer du *picro-carminate d'ammoniaque ;* du *carmin aluné ;* de l'*hématoxyline* et quelques *couleurs d'aniline.*

Picro-carminate d'ammoniaque. — Introduit par Ranvier dans

(1) Ces méthodes d'inclusion ne sont vraiment avantageuses que quand on emploie la coloration en *masse.*

(2) Il existe des méthodes permettant de fixer la coupe sur le porte-objet. Nous les retrouverons plus loin. Méthodes embryogéniques.

(3) Ce livre étant écrit pour les débutants nous ne croyons pas devoir décrire tous les réactifs colorants. Il en existe un nombre considérable.

la technique histologique ce réactif est actuellement le plus employé de tous les colorants. On peut se procurer chez M. Cogit du picro-carminate convenablement préparé ; celui qu'on trouve chez les droguistes ne donne que de mauvaises colorations. Chaque histologiste possède une méthode spéciale pour la fabrication du picro-carmin, nous en indiquerons deux qui nous ont fourni des résultats assez satisfaisants.

1re *Méthode.* — Prendre cinq grammes de carmin nº 40, le triturer dans un mortier avec 12 c.c. d'ammoniaque. D'autre part dissoudre 5 gr. d'acide picrique dans 500 c c. d'eau distillée, verser le carmin dans l'acide picrique en agitant vivement. Abandonner à l'air pendant un ou deux mois jusqu'à ce qu'il se soit développé un grand nombre de moisissures. Filtrer et conserver dans un flacon avec un cristal de thymol.

2e *Méthode.* — Peser cinq grammes de carmin nº 40, le triturer dans un mortier avec 10 c c. d'ammoniaque. Ajouter 400 c c. d'eau distillée. A l'aide d'un agitateur en verre, prendre une goutte de cette teinture et la laisser tomber sur du papier à filtrer. On obtient ainsi une tache franchement rose par transparence. Ajouter une solution saturée d'acide picrique dans l'eau jusqu'à ce que les taches obtenues sur le papier à filtrer présentent, par transparence, une teinte *rouge sang.* S'il se forme autour de la tache rouge une auréole jaune c'est qu'il y a trop d'acide picrique, on ajoute du carmin dissous dans l'ammoniaque. Après quoi on abandonne le picro-carminate à l'air pendant un ou deux mois, quand s'il est formé un grand nombre de moisissures et que la solution est bien pourrie, on filtre et on conserve avec un cristal de thymol. Cette méthode est employée dans quelques laboratoires nous ignorons à qui elle appartient (1).

Manière de colorer les coupes avec le picro-carmin. — On peut se servir de picro-carminate pour teindre les tissus fixés par n'importe quel réactif fixateur ; mais c'est après *l'alcool* et après l'inclusion dans la gomme qu'on obtient les meilleurs résultats. A l'aide d'une aiguille, on mène une coupe sur la lame porte-objet ; on éponge l'eau en excès avec du papier à filtrer, puis on laisse tomber sur la coupe une goutte de picro-carmin. On examine avec un objectif faible, et quand on juge la coloration suffisante, on couvre d'une lamelle. On substitue ensuite un

(1) Pendant que le carmin pourrit, il se peut qu'une certaine quantité de ce colorant se précipite quelle que soit la méthode employée. On ajoutera alors un peu d'ammoniaque et on abandonnera de nouveau la solution à la putréfaction.

liquide conservateur au picro-carminate, en prenant les précautions que nous indiquerons plus loin.

Les coupes de tissus fixés par l'*acide osmique* et par les *bichromates* se colorent très difficilement par le picro-carminate. Il convient de modifier la technique précédente. Les coupes seront placées pendant 24 heures dans un petit tube bouché, rempli d'une teinture formée de parties égales de picro-carminate et d'eau. On les lavera ensuite, et on les montera comme il a été dit pour les coupes faites après l'alcool. Cette méthode ne donne pas les résultats remarquables qu'on obtient lorsqu'on emploie la technique précédente. En effet, les lavages que l'on est dans l'obligation de faire subir aux coupes, enlèvent l'acide picrique, et font disparaître les nuances de coloration, que l'on obtient après l'action du picro-carminate. On n'a plus que la coloration par le carmin.

Carmin à l'alun. — Il existe plusieurs formules de carmin à l'alun ; nous donnerons celle de Grenacher qui nous a fourni d'excellents résultats :

Alun d'ammoniaque....................	1 à 5 gr.
Carmin............................	4 gr.
Eau distillée........................	100 gr.

On fait bouillir pendant 20 minutes dans une capsule, en ayant soin de maintenir le volume primitif en ajoutant de l'eau. On filtre et on conserve avec un cristal de thymol. Le carmin aluné de Grenacher est un colorant nucléaire de premier ordre : il teint admirablement les noyaux des tissus fixés par l'acide *osmique*, ce qui le rend précieux dans nombre de cas où le picro-carminate ne fournit aucun résultat. En outre, la coloration se conserve bien dans la glycérine.

Pour colorer des coupes on les place, pendant quelques heures, dans un verre de montre contenant un c. c. de carmin aluné, puis on les lave jusqu'à ce que l'excès de matière colorante ait été écarté.

Cette teinture possède en outre, la qualité d'être extrêmement pénétrante, c'est avec elle qu'il convient de colorer les tissus « en masse ». Au sortir des lavages, qui suivent l'action du fixateur, la pièce sera placée dans un tube à essai contenant 2 ou 3 c. c. de carmin aluné. Après un séjour variable (un ou deux jours) elle sera transportée dans de l'eau filtrée qu'on renouvellera tant qu'elle prendra du carmin. Puis on la portera successivement dans l'alcool et dans les différents liquides permettant d'en faire l'inclusion.

En combinant la coloration du picro-carminate avec celle du carmin aluné on obtient des préparations dans lesquelles les éléments sont différenciés d'une façon remarquable. Voici comment il convient de procéder. La coupe colorée au carmin de Grenacher et bien lavée est placée sur une lame avec une goutte de picro-carminate étendu d'eau. On couvre d'une lamelle et on examine les progrès de la coloration à l'aide d'un faible grossissement. On peut encore obtenir de bons résultats en teignant une coupe avec du carmin aluné et en la montant dans de la glycérine à laquelle on a ajouté une goutte de picro-carminate.

Hématoxyline. — Il existe un assez grand nombre de teintures à l'hématoxyline. La plupart répondant à des cas spéciaux, nous les retrouverons dans le cours de ce livre, nous nous contenterons de donner la formule dont on doit faire le plus souvent usage, c'est celle de Ranvier.

Pour obtenir la teinture à l'hématoxyline de Ranvier on commence à préparer la solution de Bœhmer.

A	Hématoxyline cristallisée..................	1
	Alcool absolu.............................	12
B	Alun....................................	1
	Eau distillée............................	320

Mélanger dans un flacon à large ouverture les deux solutions A et B et abandonner le tout pendant 2 ou 3 mois. Au bout de ce temps il s'est formé un précipité abondant sur les parois du flacon. Décanter le liquide, racler le précipité qui doit être *soigneusement lavé* à l'eau distillée sur un filtre. C'est en reprenant ce précipité par une solution d'alun à 1 p. 100 que l'on obtient l'hématoxyline de Ranvier. Pour le dissoudre on doit faire bouillir la solution d'alun pendant 15 ou 20 minutes. On filtre et on conserve dans un flacon avec un cristal d'acide phénique ou de thymol.

Avec un peu d'attention il est possible d'obtenir une bonne coloration après tous les réactifs fixateurs ; mais, si l'on veut obtenir une élection nucléaire parfaite, il faut appliquer l'hématoxyline aux pièces fixées par les *bichromates*. La meilleure manière d'employer ce colorant c'est de mettre les coupes dans un verre de montre avec quelques gouttes de la teinture. Si les tissus n'ont pas séjourné trop longtemps dans le bichromate, la coloration se produit en 15 ou 20 minutes ;

dans le cas contraire il faut attendre une ou deux heures. Lorsque la coloration est parfaite on lave les coupes dans l'eau filtrée puis on les monte sur une lame pour les conserver dans une résine, ces coupes se *décolorant entièrement dans la glycérine*. Nous verrons plus loin, qu'il est possible d'obtenir de très belles préparations en combinant la coloration par l'hématoxyline avec celle de l'éosine.

Couleurs d'aniline. — Il existe un nombre considérable de couleurs d'aniline : nous conseillons vivement de s'en tenir à quelques couleurs dont on étudiera soigneusement l'action. On devra se procurer : du *vert de méthyle*, de l'*éosine*, du *bleu de quinoléine*, de la *safranine*, du *violet de gentiane* et du *bleu de méthylène*. Le meilleur moyen de les employer c'est d'en faire une solution saturée dans l'alcool absolu que l'on conservera dans des flacons bien bouchés. On filtrera au moment de s'en servir et on étendra d'un volume égal d'eau distillée. Nous retrouverons le vert de méthyle, la safranine, le violet de gentiane lorsque nous étudierons la karyokinèse le cartilage et les bactéries; il nous suffira, pour le moment, de faire connaître la coloration par l'éosine que l'on emploie habituellement comme complément de la teinture par l'hématoxyline.

La coupe colorée par l'hématoxyline de Ranvier et bien lavée est placée sur une lame porte-objet. On peut alors la colorer avec de l'éosine *soluble à l'alcool* ou avec de l'éosine *soluble à l'eau*.

La première méthode exige que l'on prépare soi-même la matière colorante. Voici le procédé indiqué par Fischer : Dans une solution aqueuse d'éosine du commerce ajouter de l'acide chlorhydrique. La matière colorante se précipite, on filtre et on lave à l'eau le précipité retenu sur le filtre. C'est ce précipité séché et repris par l'alcool absolu qui fournira la solution colorante. Pour colorer les coupes avec l'*éosine alcoolique* on monte une coupe sur une lame, on éponge soigneusement l'eau qui la baigne et on laisse tomber sur elle deux gouttes de solution colorante. Après quelques minutes la coloration est produite. Il suffit d'enlever l'excès de matière colorante en traitant la préparation par l'alcool absolu légèrement éosiné. Ce lavage doit être très rapide, sans quoi on décolorerait entièrement la coupe, puis on monte dans la résine en suivant la méthode que nous indiquerons plus loin.

La coloration à l'éosine *soluble dans l'eau* donne des résultats qui ne le cèdent en rien à ceux obtenus par la méthode précédente.

Dissoudre 1 gramme d'éosine du commerce dans 100 gr. d'eau distillée, verser sur la coupe une ou deux gouttes de cette solution. Après quelques minutes traiter la coupe par l'alcool à 90°, et par l'alcool absolu dans lesquels on aura fait dissoudre un peu d'éosine. Monter dans la résine.

Imprégnations. — On donne le nom d'imprégnation « à des colorations produites par la formation au sein des éléments, de dépôts métalliques à l'état de division très fine ». On emploie habituellement le *nitrate d'argent* et le *chlorure d'or* pour produire ce genre de colorations.

Nitrate d'argent. — On fera une solution dans l'eau distillée (1 gr. de nitrate d'argent cristallisé pour 100 gr. d'eau) que l'on conservera pour l'usage dans un flacon noir (1). Quand on veut faire une imprégnation on mélange une partie de cette solution à trois parties d'eau distillée. Deux procédés également bons peuvent être employés pour imprégner les tissus d'argent :

1° Une membrane, l'épiploon par exemple, étant laissée en place, on verse dessus la solution argentique. Lorsque le tissu commence à devenir opalescent on le transporte à la lumière solaire dans un cristallisoir rempli d'eau distillée. On monte dans la glycérine. Quelques précautions doivent être observées, si l'on veut obtenir une bonne préparation : Il faut éviter de passer les doigts sur la membrane, et si celle-ci était souillée par du sang on devrait la laver très rapidement à l'eau distillée.

2° La deuxième méthode consiste à tendre une membrane sur la lame porte-objet par le procédé de la demi-dessiccation et à verser la solution argentique sur la membrane tendue. Exposer au soleil, laver à l'eau distillée.

3° Enfin on peut retrancher à l'aide du ciseau et de la pince un lambeau de membrane et le placer au soleil dans une cuvette contenant le sel argentique en ayant soin d'agiter continuellement ; lorsqu'il est devenu blanc laiteux on lave à l'eau distillée. C'est le procédé d'imprégnation par immersion.

Le nitrate d'argent possède la propriété de dessiner le contour des cellules endothéliales en se réduisant sur le ciment intercellulaire. Dans certaines circonstances, il est bon de colorer les noyaux de ces

(1) Dans certains cas il est avantageux d'employer le nitrate d'argent solide, nous retrouverons cette technique quand nous ferons l'étude de la cornée.

cellules. On y parvient facilement en traitant la membrane bien lavée, par le carmin aluné pendant une demi-heure. Laver de nouveau et conserver dans la glycérine ou dans la résine.

Chlorure d'or. — Ce réactif est employé presque exclusivement pour l'étude des terminaisons nerveuses. On fera une solution à 1 p. 0/0 que l'on conservera dans un flacon jaune. Ce réactif sera étudié avec beaucoup plus de fruit quand nous ferons l'étude technique du tissu nerveux.

§ 5. — CONSERVATION DES COUPES

Quand la coupe a été soumise sur la lame porte-objet, à l'action des réactifs colorants, on achève la préparation en la montant dans une substance qui assure sa conservation. Les agents conservateurs, inventés dans ce but, sont très nombreux ; mais l'utilité de la plupart d'entre eux est très discutable et, dans la pratique on s'en tiendra à trois variétés d'agents conservateurs. On choisira un liquide ayant une réfringence se rapprochant de celle de l'eau ; un liquide ayant un indice de réfraction plus élevé et une substance possédant un indice de réfraction trés élevé.

1. **Eau phéniquée.** — Parmi les liquides ayant un indice de réfraction faible, nous conseillons l'eau phéniquée à 1 p. 100. Ce liquide conserve bien les préparations colorées au picro-carminate et donne d'assez bons résultats avec les couleurs d'aniline pourvu qu'on prenne la précaution d'y ajouter un peu de la solution qui a servi à colorer la coupe. Le seul inconvénient qu'il présente, c'est de s'évaporer facilement et de nécessiter l'emploi d'une cellule. (Voyez plus loin.)

Pour conserver les couleurs d'aniline (1) on peut encore employer la gomme arabique à l'acétate de potasse de Hoyer. On prend un flacon à large ouverture qu'on remplit aux deux tiers de gomme arabique en fragments. On ajoute de la solution officinale d'acétate de potasse. Après quelques jours on obtient une solution sirupeuse qu'on filtre à travers du papier mouillé, la filtration est très lente. On met une goutte de cette solution sur la lamelle et on recouvre la prépara-

(1) Les coupes teintes par les couleurs d'aniline se décolorent fatalement au bout d'un temps plus ou moins long, quel que soit le liquide conservateur employé.

tion. Ce liquide a l'avantage de sécher sur les bords de la lamelle et de fixer provisoirement le couvre objet.

2. **Glycérine**. — C'est assurément la glycérine qui forme le milieu conservateur le plus employé en histologie. Elle fournit d'excellents résultats si l'on suit scrupuleusement les règles que nous allons donuer. On se procurera trois sortes de glycérine.

a. — Uue glycérine *neutre* aussi dense que possible. La glycérine de Price que l'on trouve dans toutes les pharmacies possède ces deux qualités, c'est elle que l'on choisira. On montera dans la glycérine neutre et pure les coupes au picro-carminate quand on ne tiendra pas à conserver la coloration de l'acide picrique. On pourra y conserver, pendant quelques jours, les coupes teintes par les couleurs d'aniline si l'on a soin de l'additionner d'une très petite quantité du colorant.

b. — Une glycérine *additionnée de picro-carminate.* On ajoutera du picro-carmin à de la glycérine neutre jusqu'à ce qu'elle présente la teinte du sirop de groseille. C'est le conservateur de choix de la double coloration par le picro-carminate.

c. — Une glycérine *acide*. On pourra prendre indifféremment de la glycérine contenant 1 p. 0/0 d'acide acétique ou d'acide formique. La glycérine acétique et la glycérine formique conviennent pour les coupes un peu épaisses dont on veut mettre en évidence les noyaux et les parties élastiques. A la longue les préparations se décolorent.

Quelle que soit la glycérine employée, il est *indispensable de ne la faire agir que très lentement* sur les tissus. C'est là une règle qui ne souffre pas d'exceptions, aussi nous allons entrer dans quelques détails. La coupe étant placée sur le porte-objet dans une goutte de picro-carminate et la coloration étant suffisante on éponge l'excès de matière colorante avec du papier à filtrer. On laisse évaporer pendant quelque temps ce qui reste de picro-carminate sur la coupe en ayant soin toutefois de ne pas laisser sécher cette dernière. Cette demi-dessiccation (1) suffit pour assurer l'adhérence de la coupe sur la lame. On laisse tomber une goutte de picro-carminate sur le porte-objet à côté de la coupe, puis on prend une lamelle que l'on applique par un de ses bords sur la goutte du colorant et on la laisse tomber douce-

(1) Le tour de main de la demi-dessiccation est très délicat. Il faut laisser sécher suffisamment, mais il faut éviter de laisser trop sécher. Si on voit que la coupe sèche trop vite il faut la maintenir humide en y projetant l'haleine jusqu'à ce qu'on place la lamelle.

ment sur la coupe. Si l'opération a été bien conduite la lamelle entraîne le picro-carmin qui recouvre la coupe sans que celle-ci se déplace. On enlève ensuite l'excès de colorant avec du papier à filtrer. C'est le moment de substituer la glycérine au picro-carminate. Dans ce but on dépose près d'un des bords de la lamelle une goutte de glycérine et à l'aide d'une aiguille on fait toucher le picro-carmin qui est sous la préparation à la glycérine. La glycérine pénètre alors par capillarité entre la lame et la lamelle tandis que le picro-carmin s'évapore du côté opposé. On se gardera bien de hâter la pénétration de la glycérine en aspirant le picro-carmin à l'aide d'un morceau de papier filtre placé sur le bord de la lamelle du côté opposé à la glycérine. On obtiendrait ainsi une mauvaise préparation ; on se contentera de laisser le picro-carmin s'évaporer de lui-même. Dans certains cas il y a même avantage à rendre la pénétration de la glycérine plus graduelle, on y arrive en plaçant la préparation dans la *chambre humide.*

Résine Dammar. — On peut employer le baume du Canada ou la résine Dammar quand on a intérêt à avoir un milieu conservateur possédant un indice de réfraction élevé. Nous conseillons de choisir la résine Dammar. On met des fragments de résine Dammar dans un flacon à large ouverture avec une certaine quantité de benzine rectifiée. Après un ou deux jours la résine est presque entièrement fondue, on agite puis on abandonne le flacon bien bouché en ayant soin de ne plus le remuer. Les matières étrangères, qui existent en quantité plus ou moins considérable dans la résine, se précipitent au fond du flacon. Il se forme deux couches : l'une inférieure, trouble, l'autre supérieure claire, c'est cette dernière qui, décantée avec soin, fournira le milieu conservateur. On pourrait encore, au lieu de laisser déposer les matières étrangères, filtrer la solution à travers du papier. Il convient alors de recouvrir le flacon et l'entonnoir où se fait la filtration, d'une cloche en verre pour éviter l'évaporation de la benzine.

On peut monter dans la résine les coupes colorées par une teinture quelconque ; mais nous conseillons de réserver ce mode de conservation pour les préparations teintes par l'*hématoxyline* et l'*éosine* ou par les *couleurs d'aniline.*

La coupe étant placée sur la lame on enlève, à l'aide de papier filtre l'excès de matière colorante, puis après l'avoir *déshydratée* soigneusement on *substitue* à l'alcool un *dissolvant* de la résine. Enfin on remplace ce dernier par la solution de dammar dans la benzine.

a. — La déshydratation s'obtient en traitant la coupe successivement par de l'alcool à 90° et par l'alcool absolu.

b. — On éponge ensuite avec du papier buvard l'excès d'alcool absolu et on laisse tomber sur la coupe une goutte d'essence de *bergamote.* On pourrait également se servir d'essence de girofle, mais l'essence de bergamote est préférable parce qu'elle ne dissout pas les couleurs d'aniline. Sous l'influence de l'essence on voit la coupe *s'éclaircir* et devenir entièrement transparente. S'il y a quelques points opaques, c'est que la coupe n'est pas suffisamment déshydratée. On traite de nouveau par l'alcool absolu que l'on remplace par de l'essence après une ou deux minutes. Pendant ces manipulations il faut éviter, avec soin, de tenir la lame près d'un cristallisoir plein d'eau ou de projeter l'haleine sur la coupe.

c. — Enfin, on enlève l'excès d'essence et on recouvre avec une lamelle sur laquelle on a placé une grosse goutte de dammar en solution dans la benzine. Si la préparation a été bien déshydratée et convenablement éclaircie elle doit être entièrement transparente, dans le cas contraire il se forme des taches laiteuses qui empêchent l'observation. On peut cependant sauver une semblable préparation, il suffit de dissoudre le dammar avec de la benzine et de traiter de nouveau par l'alcool absolu et par l'essence. On ne se préoccupera pas des bulles d'air qu'on a pu enfermer avec la préparation ; si elles sont peu volumineuses elles se dissolvent en quelques jours dans la résine.

Ciments et cellules. — Les préparations montées dans le baume ou dans la résine dammar sont entièrement achevées quand on a placé le couvre-objet. La résine sèche et la lamelle est fixée. Il n'en est pas de même pour les préparations montées dans l'*eau* ou dans la *glycérine.* Une dernière manipulation est nécessaire pour rendre la lamelle adhérente et empêcher l'évaporation du liquide conservateur : c'est le *lutage* du couvre-objet à l'aide d'un *ciment.*

Ciments. — Il existe un grand nombre de ciments. On en trouve de bien préparés chez les marchands d'articles de microscopie. Le *Maskenlack* n° 3 est un ciment à base d'alcool séchant vite et ne se fendillant pas que nous conseillons de prendre chez M. Cogit. Pour ceux qui tiennent à fabriquer eux-mêmes leur ciment, nous donnons ici la composition du lut à la cire à cacheter et au baume du Canada, excellentes préparations que tout histologiste doit posséder.

Pour préparer le *lut à la cire*, prendre un bâton de cire de pre-

mière qualité, le casser en petits fragments et le placer dans un flacon à large ouverture avec une certaine quantité d'alcool absolu. On chauffe au bain-marie jusqu'à ce que la cire soit entièrement dissoute. Si le lut est trop clair on fait évaporer un peu d'alcool en laissant le flacon débouché. On peut remplacer l'alcool absolu par l'*alcool à 90°*, mais il faut alors chauffer plus longtemps et laisser reposer le liquide quand la cire est fondue. Au bout de 24 heures on voit surnager un liquide huileux, plus ou moins teinté en brun, dont il faut se débarrasser, le reste servira de mastic.

Le ciment au *baume du Canada* est encore plus facile à préparer : on se procure chez un droguiste du baume du Canada sec que l'on place dans un flacon à large ouverture avec du chloroforme. On agite de temps en temps; la dissolution est complète au bout d'un jour. Si le mastic est trop liquide, ajouter des fragments de baume sec.

Revenons maintenant au lutage de nos préparations. Les préparations montées dans l'eau phéniquée doivent être nécessairement placées dans une *cellule,* c'est-à-dire dans une petite cavité close limitée d'un côté par la lamelle de l'autre par une bordure de ciment ou par un petit cadre de verre que l'on soude sur le porte-objet avec du baume. On trouve ces cadres de verre, ces cellules comme on les appelle, chez les préparateurs d'articles microscopiques, mais leur prix est assez élevé. Le plus simple est de fabriquer soi-même des cellules avec du ciment à la cire. A l'aide d'un petit pinceau trempé dans ce lut on trace sur une lame un petit carré de dimensions telles que la lamelle étant placée exactement dessus, il la déborde en dedans et en dehors (1). On laisse sécher la cire pendant quelques heures jusqu'à ce que le doigt appliqué sur la couche laisse sa trace sans enlever de la substance. On plonge alors le porte-objet dans le cristallisoir plein d'eau et à l'aide d'une aiguille on amène une coupe au centre de la cellule. On retire doucement la lame et lorsque l'eau en excès a été enlevée avec du papier filtre on laisse tomber sur la coupe une goutte de la teinture choisie. Lorsque la coloration est suffisante on remplace la matière colorante par deux ou trois grosses gouttes d'eau phéniquée. On couvre de la lamelle sur laquelle on appuie légèrement pour chasser l'excès de liquide. Cette légère pres-

(1) Il est entendu qu'on ne se sert que de lamelles carrées ; les cellules rondes et la tournette doivent être laissées aux marchands de préparations microscopiques.

sion suffit pour produire un commencement d'adhérence du couvre-objet à la couche de cire. On achève de le fixer en plaçant dessus un corps lourd, une balle en plomb convient admirablement. Pour terminer la préparation il suffit de bien nettoyer la lame et la lamelle et d'appliquer, sur les bords de cette dernière, une nouvelle couche de ciment.

Les préparations *montées dans la glycérine* sont infiniment plus commodes à fermer. Il faut, avant tout, bien nettoyer la lame et enlever toute trace de glycérine. On y arrive facilement, à l'aide d'un pinceau légèrement trempé dans l'alcool et essuyé chaque fois, que l'on passe légèrement le long des bords de la lamelle. Quand la lame est bien propre on prend une baguette de fer de deux millimètres de diamètre courbée à angle droit, de telle sorte qu'elle présente une longue branche qui servira de manche, on chauffe la petite branche à la flamme d'une lampe à alcool et on la plonge dans un bloc de paraffine. Il reste une petite quantité de paraffine fondue adhérente à la petite branche, on la porte sur les bords de la lamelle en tournant en bas l'extrémité libre de la petite branche on laisse tomber une goutte de paraffine sur un des bords du couvre-objet. On renouvelle l'opération jusqu'à ce qu'on ait un certain nombre de gouttes de paraffine sur les quatre bords de la lamelle, il suffit ensuite d'appliquer à plat la petite branche du fer à paraffine, préalablement chauffé, pour étendre les gouttes de paraffine et obtenir ainsi une bordure de paraffine empiétant sur la lame et sur la lamelle. C'est sur cette bordure de paraffine qu'on appliquera une couche de ciment à la cire (1).

Avec le lutage de la lamelle nous avons achevé l'étude des manipulations qui permettent d'obtenir une préparation microscopique par la *méthode des coupes*. Avant de poursuivre nous croyons devoir résumer, en un tableau, les principaux temps par lesquels doit passer un tissu pour être débité en tranches minces. Nous choisirons les réactifs fixateurs dont on fait le plus souvent usage : l'*alcool*, l'acide osmique, le *bichromate d'ammoniaque*.

FIXATION PAR L'ALCOOL. — Un fragment de tissu gros comme une petite noisette est placé dans 50 grammes d'alcool à 90° on l'y laisse séjourner 24 heures.

Durcissement. — Le tissu est placé dans un cristallissoir plein d'eau pendant 20 minutes. On le porte dans une solution de gomme ara-

(1) La bordure de paraffine empêche l'alcool de la cire de diffuser sous la lamelle.

bique 24-48 heures. Après l'avoir épongé avec du papier à filtrer on le place dans 60 grammes d'alcool à 90°, 48 heures.

Coupes. — A main libre, au microtome de Ranvier ou au microtome Malassez. Les coupes sont reçues dans un cristallisoir plein d'eau où elles séjournent 20 minutes.

Coloration. — Les coupes placées sur une lame de verre sont colorées par le picro-carmin et montées, les unes, dans la glycérine acide les autres, dans la glycérine au picro-carmin.

Conservation. — Bordure à la paraffine et lutage à la cire.

FIXATION PAR L'ACIDE OSMIQUE. — Un fragment de tissu ayant un millimètre de diamètre au plus est placé dans un ou deux c. c. d'acide osmique, 12-24 heures. Lavage dans un grand cristallisoir plein d'eau, 12 heures.

Durcissement. — On peut faire les coupes à main levée au sortir de l'eau. Si le tissu est trop mou, inclusion dans la gomme.

Coupes. — A la main ou au microtome Ranvier. Les sections sont laissées dans l'eau pendant quelques minutes.

Coloration. — On les transporte dans un verre de montre plein de carmin aluné, une heure. Lavage à l'eau, 5 minutes.

Conservation. — On les monte dans l'eau et on fait passer sous la lamelle de la glycérine neutre. Bordure à la paraffine et à la cire.

FIXATION PAR LE BICHROMATE D'AMMONIAQUE. — Un fragment de tissu ayant un centimètre ou un centimètre 1/2 de diamètre est placé dans 100 grammes de bichromate d'ammoniaque. On l'y abandonne pendant 10 jours, en renouvelant plusieurs fois la solution. Lavage dans une grande quantité d'eau à laquelle on ajoute un cristal de thymol ou d'acide phénique. 24 heures.

Durcissement. — Enrobage dans la gomme par les procédés ordinaires.

Coupes. — Au microtome Ranvier ou au microtome Malassez les coupes sont reçues dans l'eau, 20 minutes.

Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine.

Conservation dans la résine dammar.

CHAPITRE DEUXIÈME

MÉTHODES POUR L'EXAMEN DES OBJETS MEMBRANEUX

Il n'y a pas de préparations plus instructives que les objets membraneux examinés à plat après fixation et coloration. Nous décrivons plusieurs méthodes répondant à des indications différentes, chacune d'elles doit être familière au jeune histologiste.

1. **Fixation des objets membraneux laissés dans leur situation normale.** — La méthode de choix consiste à fixer les membranes, sans leur avoir fait subir de tiraillements, dans la situation quelles occupent pendant la vie de l'animal. Malheureusement elle n'est applicable que dans un nombre de cas très restreint. Quand on veut l'employer il faut choisir un réactif fixateur qui agisse avec une très *grande rapidité* et qui ne détermine pas *de retraits*. Bien que l'on puisse employer l'acide picrique et le bichlorure de mercure, l'*acide osmique* nous paraît mériter la préférence. On le fera agir à l'*état de vapeurs* toutes les fois que cela sera possible ; quand il n'y aura possibilité matérielle on se servira de la solution à 1 p. 100. Le temps pendant lequel on devra laisser agir le fixateur varie de deux à dix minutes. Lorsque la fixation sera produite on pourra enlever à l'aide des ciseaux et de la pince, un lambeau de membrane sans que celle-ci se rétracte. On lavera pendant 20 minutes, on colorera au picro-carminate ou à l'hématoxyline et l'éosine, et on conservera, suivant les cas, dans la glycérine ou dans la résine.

2. **Extension des membranes par le procédé de la demi-dessiccation.** — Cette méthode a été décrite par Ranvier dans son traité technique. « Elle consiste à étendre sur une lame de verre une mem-
« brane à l'aide des doigts appliqués sur ses bords. Tant que la mem-
« brane est humide, elle se rétracte du moment qu'on l'abandonne à
« elle-même. Mais lorsqu'elle commence à sécher (et par suite de la

« chaleur des doigts qui la tendent elle sèche plus vite sur les bords), « ses bords restent adhérents au verre et, en l'attirant successivement « sur ces différents côtés on arrive à la tendre d'une façon très com- plète ». On fait alors agir un réactif fixateur qui peut être dans le cas présent, l'alcool absolu, l'acide picrique ou l'acide osmique. Puis on lave et on colore.

Cette méthode pour l'examen des membranes à plat nous conduit à donner quelques conseils sur la technique à suivre quand on veut fixer un objet membraneux destiné à être coupé. Si l'on place un pareil objet dans un liquide fixateur sans prendre les précautions que nous allons donner, on l'en sort, le plus souvent, entièrement déformé et recroquevillé de telle sorte qu'on ne sait plus dans quel sens orienter les coupes. Il faut que la pièce soit modérément tendue pendant qu'on fait agir le réactif. Rien de plus simple que d'arriver à ce résultat. On prend une soucoupe en porcelaine à fond plat, on y tend l'objet à sec, puis tandis qu'on maintient les bords avec des pinces ou même avec les doigts on y verse de l'alcool fort. Après quelques minutes on peut abandonner les pinces, la pièce ne subit plus de retrait. Voici un autre procédé qu'on emploiera toutes les fois que l'on fera usage d'un réactif agissant avec lenteur, nous avons ici en vue les bichromates. On étend la pièce sur une plaque de liège à disséquer en ayant soin de fixer ses bords avec des épingles, puis un la retourne sur un cristallisoir plein de liquide fixateur sur lequel on la laisse flotter. Après un jour ou deux on peut enlever les épingles et détacher la pièce pour la placer directement dans le liquide fixateur sans qu'aucun retrait se produise.

3. **Membranes formant des cavités closes.** — Il est très facile de fixer à l'état d'extension les membranes formant des vésicules. On prend une seringue remplie d'un liquide fixateur (alcool, acide picrique, acide osmique) et on en injecte une certaine quantité dans la cavité. Puis on lie au-dessous de la canule et on place la membrane distendue dans une certaine quantité du liquide qui a servi à faire l'injection. Au bout de quelques heures la fixation est parfaite, on incise la membrane et après l'avoir lavée on la soumet aux réactifs colorants. Cette méthode doit être rigoureusement appliquée, soit qu'il s'agisse d'examiner ces objets à plat, soit qu'il s'agisse de les débiter en coupes. Le poumon, la vessie et le tube digestif des batraciens doivent être fixés par ce procédé.

CHAPITRE TROISIÈME

MÉTHODE DE DISSOCIATION

Lorqu'on a pris connaissance de la disposition des éléments par la méthode des coupes, il est rarc qu'on soit exactement renseigné sur la forme des cellules et sur les connexions intimes qu'elles affectent entre elles. On a recours à la dissociation, c'est-à-dire à des procédés permettant d'écarter les éléments et de les isoler les uns des autres.

Les *instruments* nécessaires pour pratiquer une dissociation sont peu nombreux ; une paire de *ciseaux courbes* permet d'obtenir des tranches minces de tissu frais bien mieux que ne le ferait un bon rasoir ; deux *aiguilles droites* bicn polies, deux *pinces fines* à mors plats complètent l'arsenal indispensable pour la dissociation. « Il est bon de disposer d'une large plaque de verre, sur la face inférieure de laquelle on a collé des petits carrés de papier colorés en noir, blanc, vert et rouge. C'est sur cctte plaque qu'on plaee la lame porte-objet pour y opérer la dissociation en ayant soin de disposer les choses de manière que le fragment de tissu à dissocier se projette sur le fond qui le rend plus visible : sur le fond noir, si le fragment est blane ; sur lc fond blanc si le fragment est noir (1).

Réactifs dissociateurs. — On peut dissocier à *sec* sans faire usage de réactifs ; mais le plus souvent on fait macérer les objets à dissocier dans un réactif dissociateur.

Alcool au tiers de Ranvier. — C'est dans la plupart des cas un dissociateur de premier ordre. Nous avons déjà indiqué sa composition qu'il nous suffira de rappeler. Une partie d'aleool à 36° et 2 parties d'eau distillée. Les tissus, riches cn cellules, se dissocient très bien après un séjour de 24 heures dans ce mélange. La fixation des élé-

(1) DUVAL., Technique microscopique.

ments est très convenable et la coloration se produit très facilement.

Sérum iodé. — Après l'alcool au tiers c'est le sérum iodé qui fournit les plus belles dissociations. Voici comment Ranvier conseille de préparer ce réactif : on se procure dans un abattoir des gosselins de veau ou de mouton (c'est le nom sous lequel est connu l'utérus gravide). Une incision comprenant l'utérus et les membranes donne issue à un jet de sérum que l'on reçoit dans un flacon muni d'un entonnoir. Le liquide amniotique doit être parfaitement limpide et jaune citrin. On ajoute des paillettes d'iode au fond du flacon qu'on agite, tous les jours, de façon à mélanger l'iode à toute la masse, autrement il ne se trouverait de l'iode qu'au fond du flacon et la partie supérieure du liquide entrerait en putréfaction. Au début l'iode se dissout très lentement dans le sérum, mais, si l'on continue son action, une partie de cet iode ne tarde pas à se transformer en iodures ; ces iodures contribuent alors à dissoudre une nouvelle quantité d'iode et par suite on peut avoir au bout d'un ou deux mois, un sérum fortement iodé. Ce sérum ne convient pas pour dissocier, mais il est très bon pour ioder du sérum frais. Aussi quand on aura à sa disposition du sérum frais, on en fera deux parts : l'une servira pour fabriquer le sérum iodé fort, l'autre sera conservée dans un flacon bien bouché avec un gros cristal de thymol.

Quand on veut faire une dissociation avec le sérum iodé, on commence par préparer du sérum *iodé faible*, qu'on obtient en mélangeant 1 c. c. de sérum iodé fort à 50 c. c. de sérum iodé frais. On place dans ce liquide un fragment de tissu gros comme un pois. Au bout de 24 heures, la pièce est propre à dissocier. On peut prolonger le séjour du tissu dans le sérum iodé pendant plusieurs jours si la macération n'est pas suffisante, à condition d'ajouter de temps en temps quelques gouttes de sérum iodé fort.

Potasse caustique. — La potasse caustique, en solution forte (40 p. 100 d'eau distillée) constitue un excellent dissociateur, mais les préparations ne se conservent pas et il est impossible de les colorer. On gardara la solution de potasse dans un flacon fermé avec un bouchon de caoutchouc. On emploie la potasse en la faisant agir sur un fragment de tissu placé sur le porte-objet. Le plus souvent il suffit de couvrir d'une lamelle et d'appuyer légèrement avec une aiguille pour séparer les éléments.

Acide chromique. — On emploie l'acide chromique en solution

très faible (1 pour 5,000 d'eau). Les tissus doivent y séjourner deux ou trois jours avant d'être soumis à la dissociation.

Nous devrions encore parler de l'*acide sulfurique*, et de l'*acide nitrique*, employé seul, ou combiné au chlorate de potasse; mais ces réactifs étant indiqués pour des préparations spéciales, nous les retrouverons dans le cours de cet ouvrage. Voyons maintenant comment il convient de procéder quand on veut faire une dissociation. Nous devons décrire plusieurs méthodes, qu'il est bon de bien connaître.

Dissociation à l'aide de la demi-dessiccation. — On place le tissu sur une lame de verre, sans liquide, et lorsque les parties sont à demi desséchées, sans l'être complètement et adhérent à la lame de verre, on les divise rapidement avec des aiguilles. S'il s'agit de tissus très riches en éléments cellulaires, tels que la moelle osseuse, on obtiendra une excellente dissociation en donnant de petits coups à l'aide du plat de la lame d'un scalpel. On porte ensuite la lame sur un flacon à large ouverture pour fixer les tissus dissociés par les vapeurs d'acide osmique, on colore par le picro-carminate, et on monte dans la glycérine. Une condition indispensable du succès, c'est d'opérer très rapidement avant que la dessiccation ne soit trop avancée.

Dissociation dans un liquide. — Lorsque les tissus ont séjourné dans l'alcool au tiers ou dans le sérum iodé faible, la dissociation est extrêmement facile. A l'aide des ciseaux courbes, on retranche un très petit fragment de tissu qu'on porte sur une lame dans une goutte du liquide dissociateur. Une légère agitation pratiquée à l'aide des pinces suffit pour mettre les cellules en liberté. On ajoute une goutte de picro-carminate que l'on mélange à l'alcool au tiers avec la pointe d'une aiguille, puis on couvre d'une lamelle. Cette dernière partie de l'opération doit être conduite avec beaucoup de soin, car il arrive que toutes les cellules sont rejetées en dehors de la lamelle, si celle-ci est placée trop vivement. Nous conseillons d'avoir recours au procédé de la demi-dessiccation : en inclinant la lame sur un de ses côtés on amène les éléments en suspension à la partie la plus déclive de la goutte. On enlève à l'aide du papier à filtrer, l'excès du liquide, puis on place la lame dans une position horizontale et on l'abandonne dans cette position jusqu'à ce que la plus grande partie du liquide se soit évaporée. Par suite de cette demi-dessiccation les éléments sont fixés à la lame d'une façon suffisante pour que l'on puisse les couvrir, sans les déplacer, d'une lamelle sur laquelle on a mis une goutte

de picro-carminate. On fait ensuite passer de la glycérine picro-carminée en opérant avec une lenteur extrême dans la chambre humide.

Le procédé suivant fournit également de bons résultats : Placer un fragment de tissu dans un tube en verre contenant 10 c.c. d'alcool au 1/3. Après un séjour de 24 heures, agiter vivement, enlever ce qui reste de tissu non dissocié, et ajouter du picro-carminate. Laisser le tout en repos pendant 12 heures. Lorsque les éléments dissociés ont gagné le fond du tube, on rejette la plus grande partie du liquide, puis on aspire avec une pipette une certaine quantité du liquide tenant en suspension les éléments dissociés et colorés et on en porte une goutte sur une lame. Couvrir d'une lamelle par le tour de main de la demi-dessiccation.

La méthode précédente doit être légèrement modifiée quand il s'agit de dissocier des tissus filamenteux. Le meilleur procédé, à notre avis, c'est de dissocier à l'aide de deux pinces fines. Un fragment de tissu étant placé dans un grand cristallisoir plein du liquide dissociateur, on saisit une extrémité du faisceau filamenteux, à l'aide des deux pinces qu'on écarte lentement, jusqu'à ce que le faisceau soit divisé en deux parties. On renouvelle cette opération sur l'un des faisceaux obtenus jusqu'à ce que l'on ait un très petit faisceau contenant un nombre peu considérable de filaments. Monter sur une lame, colorer et couvrir d'une lamelle par les procédés ordinaires.

Dissociation par injection interstitielle. — Cette méthode a été introduite par Ranvier dans la technique histologique. On prend une seringue à injections hypodermiques qu'on remplit d'un liquide dissociateur ; l'*acide osmique à* 1 *pour* 1000, l'*alcool au* 1/3, le *sérum-iodé*, peuvent être employés suivant les cas. On pique l'organe avec la canule, et on pousse l'injection. S'il s'agit d'un tissu compacte on achève la dissociation avec les aiguilles ou avec les pinces, dans une petite quantité du liquide employé ; s'il s'agit d'un tissu à texture lâche, comme par exemple le tissu sous-cutané, il se forme une boule d'œdème. A l'aide de ciseaux courbes, on retranche un fragment de cette boule qu'on étale sur cette lame et qu'on couvre d'une lamelle. « Il est nécessaire de faire ces manœuvres rapidement, autrement le liquide s'écoule, les éléments écartés reviennent sur eux-mêmes, et l'injection n'a produit aucun effet utile » (Ranvier, Traité technique). Nous reviendrons sur la dissociation par injection interstitielle, car c'est la méthode que l'on doit employer de préférence quand on veut étudier le tissu conjonctif lâche.

CHAPITRE QUATRIÈME

EXAMEN DES OBJETS VIVANTS

Contrairement à l'ordre suivi par les auteurs, nous avons placé cette méthode d'examen histologique à la fin de notre étude sur la technique générale. C'est que les procédés, qu'elle met en usage, tout en étant extrêmement délicats, ne fournissent, la plupart du temps, que des résultats très difficiles à interpréter. L'étudiant marcherait à un insuccès certain s'il débutait dans ses travaux, par la méthode que nous allons décrire. Elle doit rester une méthode de vérification et d'expérimentation et ne doit être appliquée que lorsqu'on a acquis une certaine dose d'expérience.

Quand on veut examiner un objet vivant il faut avant tout le placer dans les conditions où il se trouve pendant la vie. On l'examinera dans le liquide qui le baigne naturellement ou dans un liquide artificiel qui en diffère peu par sa composition chimique ; de plus on le maintiendra dans des conditions hygroscopiques et thermiques telles que les mouvements vitaux des cellules ne soient pas interrompus.

Liquides indifférents. — De tous les liquides indifférents, c'est-à-dire paraissant ne pas avoir d'action sur les éléments anatomiques, l'*humeur aqueuse* est celui qui est le plus facile à se procurer et qui, en même temps, fournit les meilleurs résultats. A l'aide d'une pipette en verre à pointe très aiguë (1) on ponctionne la chambre antérieure de l'œil chez l'animal dont on veut étudier un tissu. Immédiatement l'humeur aqueuse pénètre par capillarité dans la partie la plus étroite, on achève de la puiser en aspirant légèrement. C'est dans une

(1) Lorsqu'on veut étirer un tube de verre pour faire une pipette il faut avoir bien soin de ramollir également la partie qui doit être étirée. On la retire de la flamme avant de l'étirer.

goutte de cette humeur qu'il convient de placer la préparation ; on peut remplacer l'humeur aqueuse par le *sérum sanguin* privé de ses globules, par le liquide *céphalo-rachidien*, ou mieux encore par le *liquide amniotique*. En général il est préférable de s'adresser à ces liquides de l'organisme, que de prendre un des nombreux *sérums artificiels* qui ont été fabriqués pour les remplacer. Nous ferons cependant exception en faveur de la *solution physiologique de sel* qui conserve fort longtemps les mouvements des cils vibratiles.

Eau	1000
Chlorure de sodium.....................	7 gr. 5

C'est ce liquide que nous emploierons pour examiner les embryons de poulet au début de l'incubation. D'après certains auteurs on remplace avec avantage l'eau salée par le sérum artificiel de Kronœker.

Eau distillée.........................	1000
Soude caustique.......................	0 gr. 6
Chlorure de sodium....................	6 gr.

Chambre humide à air. — Il ne suffit pas de placer un objet dans un liquide indifférent pour mettre les éléments anatomiques dans les conditions qu'ils occupent pendant la vie, il faut encore les mettre à l'abri de l'évaporation tout en permettant à l'oxygène d'arriver jusqu'à eux. Si l'observation doit être faite rapidement il suffit de border à la paraffine. Si elle doit être prolongée, il faut monter la préparation dans une chambre humide porte-objet. On peut fabriquer une chambre humide extrêmement simple en employant le procédé suivant indiqué par M. Duval (1) : « Sur une plaque de verre (dite plaque porte-objet) on place une lamelle circulaire de sureau, lamelle dont la partie centrale a été enlevée de telle sorte qu'il n'est resté en définitive qu'un anneau de moelle de sureau : cet anneau est imbibé d'eau. On dispose les éléments à examiner (dans le cas cité par M. Duval c'est une goutte de sang ou de lymphe) à la face inférieure d'une lamelle de verre dont on recouvre cet anneau de sureau. Mettant alors au foyer du microscope la face inférieure de cette lamelle, on peut y observer les éléments anatomiques contenus dans une mince couche de liquide, dont l'évaporation est empêchée par l'humidité qu'émet la substance spongieuse du sureau dans le petit

(1) Précis de Technique microscopique et histologique.

espace clos, limité en bas par la lame et en haut par la lamelle de verre ». On trouve dans le commerce une chambre humide construite sur les indications du professeur Ranvier : elle est formée d'un porte-objet au milieu duquel on a creusé une rigole circonscrivant un pla-

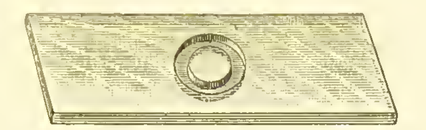


FIG. 14. — Chambre humide à air.

teau dont l'épaisseur mesure 0 millim. 1 de moins que la lèvre externe de la rigole. On dépose l'objet à examiner sur ce plateau dans une goutte de liquide indifférent et on recouvre d'une lamelle qu'on fixe à la paraffine. L'objet est ainsi placé à l'abri de l'évaporation tout en étant soumis à l'action de l'air logé dans la rigole (1). Cette chambre humide est indispensable dans un grand nombre d'observations histologiques, son prix peu élevé (2) la met à la portée de toutes les bourses.

Platine chauffante. — Afin de rendre l'observation des tissus aussi rigoureuse que possible on a eu l'idée de les placer dans une atmosphère chauffée à leur température normale. Il existe un grand nombre de platines chauffantes permettant de réaliser cette condition expérimentale. Celle du professeur Ranvier possède l'immense avantage d'être d'un maniement très simple et de fournir en même temps une température constante pendant plusieurs heures. « Elle consiste en une caisse de laiton rectangulaire qui porte, à sa partie moyenne, une fente horizontale pour permettre d'y glisser la préparation. Au centre, elle est percée d'un trou qui correspond au trou de la platine ordinaire et qui laisse passer la lumière. Ce trou est assez large pour permettre à l'objectif d'arriver jusque sur la préparation. Elle porte en arrière une tubulure pour y loger un thermomètre et en avant deux autres tubulures sur lesquelles sont adaptés des tubes de caoutchouc qui communiquent avec une marmite close en laiton. » Pour se servir de la platine chauffante on place le microscope sur un support légèrement plus élevé que la marmite. On remplit celle-ci d'eau à 39° ou 40° et on maintient la température à l'aide d'une veilleuse ou

(1) RANVIER. Traité technique d'histologie, page 45.
(2) Elle coûte 2 francs chez M. Cogit.

d'une petite lampe à alcool. On glisse la préparation, montée dans une chambre humide porte-objet, dans la fente de la platine et on abaisse l'objectif. Si l'observation doit être de longue durée il est bon d'achever de clore l'ouverture par laquelle pénètre l'objectif à

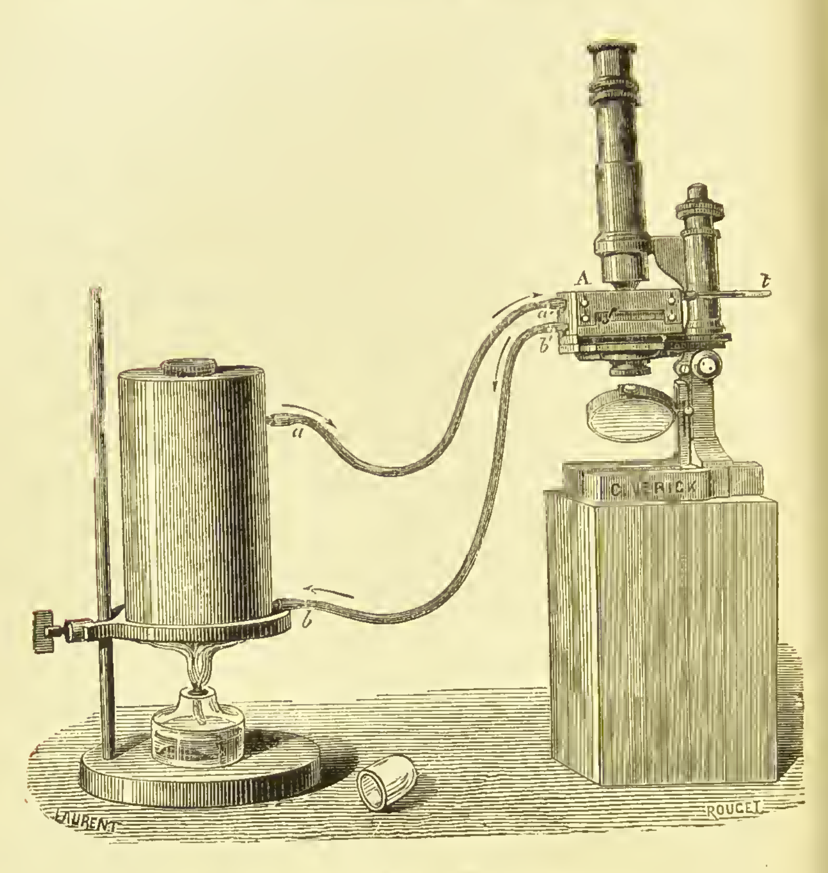


FIG. 15. — Platine chauffante du Professeur RANVIER.

l'aide d'une couronne de ouate. Par suite de la situation des deux tubes l'un à la partie supérieure, l'autre à la partie inférieure de la marmite, « il s'établit, entre la marmite et la platine une circulation constante qui maintient l'eau à la même température dans les deux récipients ». (Ranvier : Traité technique.) Cette platine chauffante est un instrument de laboratoire ; le travailleur isolé pourra se construire lui-même un petit appareil permettant d'obtenir une température

élevée suffisamment exacte. On courbe deux fois à angle droit un tube de verre de 1/2 centim. de diamètre de façon à former un rectangle dont il manquerait un petit côté. Les deux grandes branches doivent être disposées de telle sorte que, l'appareil étant placé sur la platine du microscope, elles dépassent la platine par leur extrémité libre tandis que leur extrémité coudée qui se continue avec le petit côté du rectangle, repose sur le bord de la platine. Ce tube étant fixé sur la platine à l'aide des valets, on fait communiquer une des grandes branches avec un tube de caoutchouc plongeant dans un ballon dans lequel on maintient de l'eau à une température déterminée (il faut chauffer de 5° à 6° au-dessus de la température que l'on veut avoir sur la platine), on adapte à l'autre branche un tube de caoutchouc pour servir à l'écoulement du liquide. L'appareil doit être amorcé comme un siphon et l'écoulement réglé à l'aide d'une pince à burette. Il suffit de placer la préparation sur ce petit appareil pour obtenir pendant quelques instants une température suffisamment fixe pour bon nombre d'observations (1).

Porte-objet électrique. — Il est intéressant, quand on a pris connaissance d'un tissu à l'état physiologique, de l'exciter et d'observer en même temps les modifications qui se produisent dans les éléments anatomiques. On se sert habituellement d'un de ces appareils faradiques dont on règle le courant, en modifiant la situation de la bobine d'induction (2). On place le tissu à examiner sur un porte-objet, dont la face supérieure est recouverte de deux lames d'étain terminées en pointe. Entre les pointes des lames qui convergent vers le centre du porte-objet, existe un petit espace libre sur lequel doit-être placé l'objet. Pour se servir de cet appareil il suffit de faire communiquer chaque lame d'étain avec un des réophores de la bobine induite, ce qui s'obtient facilement en plaçant sur le porte-objet deux balles de plomb que l'on a fixées sur les réophores. Il faut toujours faire agir des courants très faibles sans quoi on serait exposé à tuer les tissus en observation.

(1) FRANCOTTE. Technique microscopique. La petite branche de l'appareil doit être plus courte que le petit diamètre du porte-objet ordinaire ; on lui donnera 1 centim. 1/2 à 2 centim.

(2) Les petits appareils faradiques qu'on trouve dans le commerce sous le nom d'appareils électro-médicaux conviennent également pour ce genre d'étude.

bout de deux ou trois heures, la préparation sera fortement colorée, on enlèvera la paraffine, et on fera passer sous la lamelle au moyen du papier buvard, un peu d'eau puis de la glycérine contenant 1 0/0 d'acide acétique. On verra les faisceaux conjonctifs se gonfler, se décolorer et montrer de distance en distance les *fibres spirales de Henle* colorées en rouge.

2. *Cellules.* — La méthode précédente est insuffisante pour l'étude des cellules fixes, du tissu conjonctif. On obtient de belles préparations montrant les prolongements anastomotiques de ces cellules en faisant une boule d'œdème avec une solution d'éosine à 1 0/0 dans l'alcool au 1/3. Un fragment étant porté sur la lame, comme dans le cas précédent, on place sur la face inférieure d'une lamelle une grosse goutte de glycérine salée légèrement éosinée qu'on laisse tomber sur la préparation en ayant soin de ne pas faire de compression avec la pointe de l'aiguille. L'examen doit être fait avec un objectif à grand angle d'ouverture.

On trouve dans le tissu conjonctif qui forme le squelette des organes, outre les cellules plates dont nous avons indiqué les réactions, des éléments spéciaux désignés par Erlich sous le nom de cellules à granulations ou de cellules plasmatiques (Plasmazellen); voici comment il convient de procéder pour observer les cellules d'Erlich. La langue de la grenouille (1) dont on a enlevé l'épithélium par le raclage, est placée pendant 24 heures dans l'alcool fort. Il faut avoir soin de bien l'étendre comme il a été dit page 57. On la transporte ensuite dans la solution suivante où elle doit séjourner 24 heures.

Alcool absolu........................	50 c. c.
Acide acétique cristallisable..............	12 gr. 5
Eau distillée........................	100 gr.

Dahlia. Q. S. pour que la solution soit presque saturée.

Lorsque la coloration est produite, on lave la langue dans l'alcool pendant quelques minutes et on la monte dans la résine. Tous les éléments sont décolorés à l'exception des cellules d'Erlich dont le protoplasma est coloré en violet intense, tandis que le noyau est incolore (1).

(1) On trouve ces cellules dans un très grand nombre d'organes, nous avons choisi la langue de la grenouille, parce qu'elles y sont très multipliées.

Les fibres élastiques qui entrent dans la composition du tissu conjonctif des organes seront étudiées sur des coupes de peau durcie par l'action successive de l'alcool et de la gomme. Nous décrirons plus loin un procédé permettant d'étudier les organes très riches en fibres élastiques; nous indiquerons seulement ici la technique de coloration des fibres élastiques par l'éosine. Une coupe, fortement colorée sur le porte-objet à l'aide de l'éosine à l'alcool ou à l'eau, est traitée par la solution de potasse à 40 p. 100. On couvre d'une lamelle et on examine la préparation montée dans la solution de potasse. Les fibres élastiques ont seules conservé la coloration rose.

§ 2. — TISSU MUQUEUX

On prendra de préférence pour étudier le tissu conjonctif embryonnaire un cordon ombilical ou un embryon de mammifère. Dans une série de préparations on fera des *boules d'œdème* avec du *sérum fortement iodé* (Ranvier) ou avec de l'*éosine* en solution dans l'*alcool au 1/3*, et on en examinera des fragments comme il a été dit pour le tissu conjonctif lâche. Dans une autre série, on fera des *coupes* de cordon ombilical fixé suivant des méthodes différentes : Les unes après l'*alcool* et la gomme, les autres après le *bichromate à 2 0/0* 8 jours) ; lavage à l'eau (4 heures) ; gomme (un jour), alcool. On colorera les premières avec le *picro-carmin*, les autres avec l'*hématoxyline* de Ranvier et l'*éosine*. Ces dernières seront montées dans la résine Dammar, après déshydratation par l'alcool absolu et éclaircissement par l'essence de bergamote.

§ 3. — TISSU ADIPEUX

En faisant une boule d'œdème dans le tissu sous-cutané avec une solution de nitrate d'argent à 1 p. 1000 on obtient des tranches de tissu dans lesquelles on étudiera les éléments constitutifs des cellules adipeuses (Ranvier). La membrane enveloppe le noyau ; le protoplasma et la graisse sont très apparents, mais on pourra compléter cette étude d'ensemble par un certain nombre de réactions faciles à obtenir.

On dissociera du tissu adipeux et l'on mettra les fragments à ma-

cérer dans l'*éther*. Au bout d'une heure ou deux, la graisse sera dissoute et on pourra voir les membranes enveloppes des vésicules revenues sur elles-mêmes, plissées de différentes façons ce qui permettra très bien de constater leur présence. Un autre procédé consiste à faire des coupes sur un fragment de peau après inclusion dans la paraffine. Dans ces conditions on trouve, dans le tissu cellulaire sous-cutané, un certain nombre de vésicules privées de graisse par suite de l'action de l'essence de bois de cèdre.

Dans les tissus vivants, la graisse se montre à l'état liquide sous forme de gouttelettes très réfringentes, possédant les caractères optiques des corps placés dans un milieu moins réfringent ; claires et brillantes quand on approche l'objectif, elles deviennent obscures quand on l'éloigne. Dans les tissus morts on trouve, au centre de chaque vésicule, non plus une goutte liquide, mais un ensemble d'aiguilles cristallines figurant assez vaguement une rosace. Ces aiguilles paraissent être des cristaux de margarine produits par un dédoublement de la graisse.

Nous terminerons l'étude du tissu adipeux en indiquant l'action des matières colorantes sur la graisse et en montrant le groupement des vésicules et leurs rapports avec les vaisseaux.

Deux réactifs colorants doivent être employés : l'*acide osmique* et le *bleu quinoléine*.

L'*acide osmique* colore la graisse en *brun foncé*, en *noir* si l'action a été assez prolongée. Cette coloration est caractéristique. Les cellules adipeuses que l'on trouve dans la *moelle osseuse* représentent un matériel excellent pour l'étude de cette réaction. A l'aide d'une pointe de scalpel, on enlève un petit fragment de moelle que l'on porte sur une lame et que l'on dissocie rapidement sans laisser trop sécher. En donnant de petits coups avec le plat de la lame du scalpel on obtient facilement ce résultat. La lame est ensuite retournée et placée sur un flacon à large ouverture au fond duquel on a préalablement versé un ou deux c. c. d'acide osmique. Lorsque la préparation a subi l'action des vapeurs d'osmium pendant dix ou quinze minutes on met une goutte de glycérine et on couvre d'une lamelle. La coloration noire de la graisse est d'autant plus évidente que les cellules adipeuses sont presque entièrement isolées. Quand on aura pris connaissance de cette réaction, on retrouvera facilement la graisse dans les coupes d'un tissu traité par l'acide osmique.

La réaction du *bleu de quinoléine* est très élégante, mais plus difficile à obtenir. On verse quelques gouttes d'une solution alcoolique concentrée dans un verre de montre contenant de l'eau filtrée. Les coupes sont placées dans ce liquide jusqu'à ce qu'elles aient pris une teinte bleu foncé, on les lave rapidement et on les monte dans la glycérine. Au bout de 24 heures on trouve les noyaux décolorés, le protoplasma présente une teinte bleu clair, les gouttes de graisse apparaissent sous forme de granulations d'un bleu intense. On peut produire immédiatement l'élection de la matière colorante en traitant les coupes par la potasse à 40 p. 100 (Ranvier).

Les rapports des cellules adipeuses entre elles et avec les vaisseaux seront étudiés avec fruit sur *l'épiploon du lapin* ou du jeune chat. Nous conseillons la méthode suivante : L'animal ayant été injecté avec une masse de gélatine au bleu de prusse, on enlèvera un fragment d'épiploon (1) que l'on étendra sur une lame par le procédé de la demi-dessiccation. On colorera pendant quelques minutes avec du picro-carmin, puis on exposera la préparation pendant au moins 20 minutes, à l'action des vapeurs d'acide osmique. Ce dernier réactif rendant la graisse insoluble, permet de monter la préparation dans la résine Dammar après déshydratation et éclaircissement (2).

§ 4. — TISSU CONJONCTIF MODELÉ

Tendons. — Il faut choisir pour commencer cette étude technique, les tendons filiformes de la queue du rat qui sont formés d'un faisceau unique et représentent un tendon extrêmement simple. On se les procure facilement et en abondance, en suivant le procédé suivant. On coupe la queue d'un rat au voisinage de son insertion au corps. On casse ensuite avec les doigts l'extrémité de la queue et on tire les deux fragments en sens inverse, on obtient ainsi un faisceau

(1) Après avoir fixé l'épiploon par le bichromate.

(2) Un autre colorant a été employé avec succès pour l'étude de la graisse : La teinture d'orcanette obtenue en faisant macérer dans l'alcool à 90° de la racine d'orcanette, colore la graisse en rouge. C'est après fixation par le bichromate que la réaction se montre dans toute sa pureté. Les coupes doivent rester dans le réactif colorant une demi-heure environ, elles sont ensuite soigneusement lavées et montées dans la glycérine.

de tendons filiformes semblable à un écheveau de fil que l'on conserve pour l'étude.

Endothélium. — Quelques-uns de ces petits tendons, après avoir été rapidement lavés dans l'eau distillée, sont plongés dans une solution de nitrate d'argent à 1 p. 500, on porte le vase renfermant la solution au soleil en ayant soin d'agiter constamment le tendon. Lorsque celui-ci est devenu opalescent on le lave dans l'eau distillée, on le porte dans du carmin aluné, puis on lave de nouveau et on monte dans la glycérine. Suivant que l'action du nitrate a été plus ou moins prolongée, on obtient des résultats différents : si elle a été courte, l'endothélium seul est imprégné. Si elle a été longue et si en même temps on s'est servi d'une solution argentique plus concentrée, les cellules fixes sous-endothéliales sont également dessinées.

Cellules fixes. — Pour voir le protoplasma, les crêtes d'empreinte, les ailes latérales et le noyau des cellules fixes on tendra un tendon filiforme sur une lame de verre en ayant soin de fixer ses deux extrémités par deux gouttes de paraffine. On placera, sur le milieu du tendon, une goutte de picro-carmin qu'on laissera agir pendant une heure dans une chambre humide. Le tendon ayant été lavé on mettra une lamelle avec une goutte de glycérine neutre ou de glycérine formique. Cette méthode si simple, due au professeur Ranvier, permet très bien de faire l'étude des cellules tendineuses. Au besoin on applatirait légèrement le tendon en appuyant sur la lamelle à l'aide d'une aiguille. Les anastomoses, qui mettent en relation les différentes cellules tendineuses d'un tendon, ne sont pas indiquées dans la préparation précédente. Sur des tendons examinés à plat et fortement imprégnés d'argent on peut observer ces anastomoses ; mais l'interprétation des figures produites est très délicate, aussi, nous conseillons d'avoir recours aux coupes transversales. Un fragment de la queue du rat, dépouillée de sa peau, est plongé dans une grande quantité d'une solution d'acide picrique dans l'eau. Lorsque la décalcification est complète on durcit par l'action successive de la gomme et de l'alcool. Les coupes, débarrassées de l'acide picrique par un séjour prolongé dans l'eau, sont colorées fortement dans du picro-carminate et montées dans la glycérine formique que l'on doit faire *arriver très lentement* sous la lamelle. Dans ces préparations les faisceaux tendineux sont décolorés, les cellules et leurs prolongement sont colorés

en rouge. Voici une autre méthode encore plus démonstrative. Un tendon filiforme est soumis à l'action du jus de citron pendant deux minutes puis placé dans une solution de chlorure d'or à 1 p. 0/0 pendant dix minutes. On détermine la réduction de l'or à la lumière du jour dans de l'eau acétifiée (un ou deux jours) on durcit par l'action successive de la gomme et de l'alcool. Dans les coupes transversales, ainsi obtenues, les cellules et leurs expansions sont nettement colorées en violet.

Faisceaux tendineux. — Les préparations précédentes nous ont déjà permis de faire connaissance avec les faisceaux tendineux. Leur structure fibrillaire sera mise en évidence si l'on dissocie avec des aiguilles des tendons ayant macéré dans l'*acide picrique*. On peut même dissocier les tendons du bœuf à l'état frais sans les avoir soumis à l'action des réactifs (Ranvier). Le réseau élastique si ténu des tendons pourra être observé sur des tendons soumis à l'ébullition ou mieux sur des tendons colorés à l'éosine et traités par la potasse à 40 p. 100.

Tendons composés. — Il convient de compléter cette étude par l'examen des tendons composés. Tous les tendons de l'homme et des mammifères peuvent être employés, on prendra de préférence un tendon de petit volume que l'on fixera par le bichromate d'ammoniaque à 2 p. 100. Les coupes, faites après l'action successive de la gomme et de l'alcool, seront colorées par l'hématoxyline et l'éosine, et conservées dans la résine dammar. On pourra encore tendre sur une plaque de liège, un tendon très mince qu'on laissera dessécher. Au bout d'un jour on introduira un fragment du tendon dans une fente faite dans un bouchon que l'on placera dans le microtome Ranvier en guise de moelle de sureau. Les coupes faites avec un rasoir à trempe dure, seront placées dans l'eau puis colorées par le picro-carmin et montées dans la glycérine.

§ 5. — MEMBRANES APONÉVROTIQUES

Il convient de choisir une aponévrose extrêmement simple, celle qui recouvre la cuisse de la grenouille constitue l'objet d'étude le plus élégant et le plus démonstratif. La méthode indiquée par le professeur Ranvier dans son Traité technique doit être employée de

préférencc. On éeorche une grenouille puis à l'aide d'un scalpel on eireonserit un lambeau d'aponévrosc au devant du trieeps et on l'enlève avee des pinces. A l'aide du pineeau on chasse les cellules endothéliales du sae lymphatiquc sous-cutané et les fragments de faiseeaux musculaires qui ont pu rester adhérents à la face profonde de la membrane. Celle-ci est ensuite soigneusement tendue sur une lame par le procédé de la demi-dessieeation, on colore au picro-earmin, on lave jusqu'à ce que la coloration de l'acide picrique ait disparu et on couvre d'une lamelle que l'on fixe à deux de ses bords par de la paraffine. Il suffit ensuite de faire passer unc goutte d'acide formique et de substituer, à ce dernier, de la glyeérine acide quand la préparation est devenue transparente.

On pourra compléter l'étude de eette membrane par l'emploi d'une méthode excellente indiquée par M. Renaut. Fixer l'aponévrose laissée en plaee à l'aide des vapeurs d'acide osmique, qu'on laissera agir pendant dix minutes. Enlever la membrane qui est devenue suffisamment résistante et raide, la colorer par l'éosine et l'hématoxyline. Éelaircir et monter dans la résine dammar.

§ 6. — MEMBRANES SÉREUSES

Les membranes séreuses présentent, à leur surfaee, un revêtement endothélial que l'on mettra facilement en évidenee par une imprégnation au nitrate d'argent. Il convient d'étudier la forme et les rapports de ces cellules dans les séreuses perforées et dans celles qui ne le sont pas.

Parmi les premières, on choisira le *mésentère de la grenouille* ou du jeune rat, parmi les seeondes, on prendra l'épiploon du *rat adulte* ou de *l'homme*. En prenant sueeessivement l'épiploon de sujets très jeunes et de sujets plus âgés, on assistera à la fenétration de cettc membrane. L'abdomen d'un rat étant ouvert, et l'épiploon mis à découvert, on l'incise rapidement sans le toucher avee les doigts. Il vaut mieux, si l'épiploon n'est pas souillé par du sang, le porter directement dans la solution argentique, dans le eas eontraire, on le laverait très rapidement dans l'eau distillée. Deux autres préeautions doivent être observées : faire usage d'une solution faible, et agiter eontinuellement la

membrane dans le liquide argentique tout le temps que dure l'exposition à la lumière. Après quoi, on lave largement dans l'eau distillée et on étend sur une lame par le procédé de la demi-dessiccation. Coloration au carmin aluné et conservation dans la résine dammar.

Le stroma conjonctif de ces membranes sera étudié dans les préparations suivantes :

1. Un fragment de mésentère ou d'épiploon est coloré au picro-carminate, lavé pour enlever la coloration jaune, et monté dans la glycérine ou dans la résine dammar. Cette préparation permettra d'observer les cellules et les faisceaux connectifs du mésentère, sans parler des organes contenus dans cette séreuse, que nous retrouverons plus loin. Dans ces mêmes préparations, on pourra mettre en évidence par une méthode due au professeur Ranvier, le ciment qui unit les faisceaux connectifs. La membrane tendue sur la lame et fortement colorée par le carmin, est traitée par l'alcool absolu et éclaircie par le girofle ; on fait une incision sur un point avec un rasoir bien tranchant, c'est sur les lèvres de cette incision, entre les faisceaux connectifs que l'on voit la substance cimentante légèrement colorée en rose.

2. Pour mettre en évidence les feuillets du mésentère décrits par Ranvier, on se servira du procédé suivant employé par cet auteur : on introduit une pipette bien effilée au voisinage d'un vaisseau du mésentère étendu sur une lame. On insuffle, il se forme une bulle dont on incise la calotte supérieure ; la calotte inférieure reste adhérente à la lame : c'est elle qui sert à l'observation après coloration par le picro-carmin. On peut conserver ainsi, soit le feuillet vasculaire, soit le feuillet dépourvu de vaisseaux. C'est, dans ce dernier, que l'on observera le réseau élastique du mésentère.

3. Les autres séreuses, le péricarde, la plèvre, le péritoine, les synoviales, etc., seront étudiées au moyen de coupes transversales, pratiquées après durcissement dans l'alcool. Coloration au picro-carmin et conservation dans la glycérine picro-carminée.

CHAPITRE DEUXIÈME

TISSU CARTILAGINEUX

L'étude du tissu cartilagineux est d'une simplicité extrême : dans une première série de préparations, on étudiera le cartilage hyalin. L'objet d'étude est fourni par l'appendice xiphoïde du sternum de la grenouille (1) ou encore par l'angle inférieur de l'omoplate d'un embryon de salamandre ou de triton ; dans ce dernier cas, les cellules présentent des dimensions colossales. S'il s'agit de la grenouille on dissèque avec soin l'extrémité inférieure du sternum, en enlevant soigneusement le tissu conjonctif qui le recouvre, on résèque l'appendice xiphoïde, et on le monte dans une goutte d'humeur aqueuse.

On pourra encore faire des coupes, à l'état frais, du cartilage de la tête du fémur de la grenouille. En faisant passer sous la lamelle une goutte d'*eau*, on pourra observer la rétraction du protoplasma qui donne à la cellule cette apparence étoilée, prise par plusieurs auteurs pour un état normal.

Il est facile d'étudier sur ces préparations fraîches l'action des matières colorantes ; mais il vaut mieux employer des coupes de cartilage faites après fixation par l'acide picrique. Un fragment de cartilage est placé pendant 24 heures dans une solution saturée d'acide picrique, on fait des coupes que l'on met à dégorger dans l'eau jusqu'à ce que la couleur jaune ait disparu.

a. — On place quelques-unes de ces coupes dans un verre de montre contenant du *carmin aluné*. Après quelques minutes on lave, on monte dans l'eau à laquelle on substitue de la glycérine que l'on fait arriver *très lentement* sous la lamelle. Les noyaux sont colorés en rouge lilas.

(1) La sclérotique du même animal donne également de fort belles préparations.

b. — La *purpurine* extraite de la garance a été appliquée par Ranvier à l'étude du cartilage. Voici le procédé employé par cet auteur pour la préparation de ce réactif. On fait bouillir dans une capsule 200 gr. d'eau distillée et 1 gr. d'alun, lorsque la solution est en pleine ébullition, on y ajoute de la purpurine et on continue à chauffer. Après dix minutes on filtre à chaud et on ajoute à la solution 60 c. c. d'alcool à 36° Cartier. Cette solution doit être employée fraîche car elle ne se conserve pas au delà de quelques semaines. Les coupes de cartilage sont placées dans quelques c. c. de cette solution ; elles doivent y séjourner 24 heures. On les lave à l'eau distillée et on les monte dans la glycérine : les noyaux sont colorés en rouge, la substance fondamentale en rose.

c. — La solution *d'iode iodurée* agissant sur des coupes du cartilage d'un jeune sujet permettra de déceler la présence du *glycogène*. Cette réaction se produit même sur des coupes fixées par l'acide picrique (Ranvier).

d. — L'*acide osmique* colore les gouttes de graisse contenues dans le protoplasma, en noir ou en brun foncé. On pourra employer deux méthodes également bonnes : l'une consiste à pratiquer des coupes à travers un fragment de cartilage ayant séjourné dans la solution à un pour 100, l'autre à faire agir les vapeurs d'osmium sur des coupes pratiquées après fixation par l'acide picrique. On lave et on monte dans la glycérine.

e. — On terminera l'étude du cartilage hyalin par la coloration de la substance fondamentale. Le *bleu de quinoléine* donne les meilleurs résultats : dans une soucoupe de porcelaine renfermant de l'eau filtrée on verse quelques gouttes d'une solution de bleu de quinoléine dans l'alcool. L'eau prend immédiatement une belle couleur bleue légèrement irrisée à la surface par suite de la précipitation d'une partie de la matière colorante. Si on abandonne cette solution on voit au bout d'un temps variable, le liquide entièrement décoloré et le bleu précipité au fond du vase à l'état de fines granulations (Ranvier). C'est d'une solution semblable pas trop foncée dont on doit faire usage. Les coupes, *entièrement débarrassées* de leur acide picrique, doivent y séjourner pendant quelques heures. On les lave soigneusement et on les monte dans la glycérine neutre. Les cellules du cartilage sont colorées en bleu, la substance hyaline présente une belle teinte violette. Sur des préparations ainsi colorées et traitées par la potasse

à 40 p. 100, on peut obtenir la coloration bleue des granulations graisseuses contenues dans le protoplasma des cellules.

Après avoir fait l'étude du cartilage hyalin, il conviendra d'examiner les autres variétés de cartilage.

a. — Le cartilage à *cellules ramifiées* de la tête des céphalopodes sera étudié sur des coupes pratiquées après fixation par l'acide picrique. On colorera par le picro-carmin. L'étude de cette variété de cartilage présente une certaine importance car on la retrouve, chez l'homme, dans certaines variétés d'enchondromes.

b. — Le cartilage élastique sera étudié sur des coupes de l'épiglotte de l'homme et du chien. Un fragment d'épiglotte étant fixé par l'acide picrique (24 heures), et durci par l'action successive de la gomme et de l'alcool, on fait des coupes perpendiculaires à la surface que l'on met à dégorger dans l'eau. Ces coupes une fois débarrassées de leur couleur jaune sont colorées au picro-carmin, lavées et montées dans l'eau. On fait ensuite passer, sous la lamelle, une goutte du mélange indiqué par le professeur Ranvier pour l'étude des artères.

Glycérine..	50
Sol. sat. acide picrique.	50
Acide formique.	1

c. — Pour étudier le fibro-cartilage on pratiquera des coupes sur le cartilage semi-lunaire du genou, traité par l'acide picrique, la gomme et l'alcool. Coloration au picro-carminate.

CHAPITRE TROISIÈME

TISSU OSSEUX

Deux séries de préparations devront être exécutées pour prendre connaissance de la structure des os : les unes avec des os *secs et macérés*, les autres avec des os *frais décalcifiés.*

§ 1. — COUPES D'OS SECS

On prend un os bien blanc et bien sec, de préférence un os long appartenant à un sujet adulte. Il vaut mieux ne point employer un os renfermant ces ilots translucides et jaunâtres qui décèlent la présence de la graisse. Si l'on est obligé de se servir de ce matériel on aura soin de le mettre dans l'éther ou dans la benzine jusqu'à ce que la graisse soit entièrement dissoute. On fixe l'os sur un étau et, à l'aide d'une scie fine, on en retranche une série de lamelles, aussi minces que possible, orientées les unes perpendiculairement, les autres parallèlement à la surface de l'os. On les use, ensuite, entre deux pierres ponce que l'on frotte l'une contre l'autre, en ayant soin de retourner la coupe de temps en temps et de la tenir continuellement humectée d'eau. Lorsque la lamelle est devenue mince, on lave et on achève de la polir sur la pierre à aiguiser. Le meilleur procédé est de maintenir la coupe à l'aide de la pulpe du doigt et de la frotter par un mouvement de va-et-vient. On pourrait la fixer sur un bouchon de liège à l'aide de la gomme ou sur un porte-objet avec du baume du Canada sec et se servir de ces objets pour maintenir la lamelle. Celle-ci, étant devenue suffisamment mince, on dissout la gomme par l'eau ou le baume par la chaleur afin de la détacher.

Le procédé d'usure, qui consiste à maintenir la lamelle avec la pulpe du doigt est le plus simple, c'est celui que l'on emploiera en ayant soin toutefois de garnir son doigt de diachylon, si l'on ne veut endommager son épiderme. Les tranches minces ainsi obtenues seront montées suivant trois méthodes :

1° *Examen des ostéoplastes remplis d'air.* — Une des lamelles est enduite, sur ses deux faces, d'une très mince couche de gomme ou de colle forte, qu'on fait sécher en la passant rapidement sur la flamme d'une lampe à alcool. On place ensuite un petit fragment de baume sec sur un porte-objet qu'on chauffe jusqu'à ce que le fragment soit fondu, puis on place la coupe et la lamelle. Bien que la couche de gomme dont on a enduit la coupe, empêche la pénétration du baume liquide dans les corpuscules, il est préférable de solidifier rapidement la résine en plaçant le porte-objet sur un corps froid ; une plaque de marbre convient admirablement.

2° *Examen des ostéoplastes et des canalicules colorés.* — La méthode que nous allons décrire, a été employée par Ranvier pour produire, d'une façon détournée une véritable injection interstitielle des canalicules et des corpuscules osseux. On gratte sur ses deux faces, à l'aide d'un scalpel une lamelle osseuse usée comme il a été dit plus haut. On la met dans une solution alcoolique de bleu d'aniline insoluble à l'eau chauffée au bain-marie pendant plusieurs heures. La disposition suivante permet très bien de remédier à l'évaporation du liquide. La solution colorante et la coupe sont placées dans un tube à essai fermé par un bouchon de liège percé d'un trou dans lequel on place un tube d'un mètre environ. Les vapeurs d'alcool amenées par l'ébullition dans le tube s'y condensent et retombent dans le tube à essai. Quand on a maintenu l'ébullition pendant cinq ou six heures, on enlève la coupe et on la frotte légèrement sur la pierre à aiguiser de façon à enlever les couches superficielles de ses deux faces. Il est indispensable de l'arroser pendant les opérations avec de l'eau tenant en dissolution du chlorure de sodium. La lamelle osseuse est ensuite montée dans la glycérine neutre.

3° *Examen des lamelles osseuses.* — Il est possible d'étudier la disposition des lamelles osseuses sur les préparations précédentes, nous conseillerons cependant d'employer un autre procédé. Une lamelle osseuse usée et polie, est déshydratée par l'alcool absolu. On remplace ce dernier par une goutte d'essence de bergamote, à

laquelle on substitue de la résine dammar en solution dans la benzine, lorsque la coupe est devenue entièrement transparente. Dans ces préparations, le système des ostéoplastes et des canalicules infiltré de résine est à peine visible, en revanche, l'arrangement des lamelles est très évident.

§ 2. — COUPES D'UN OS FRAIS

Ce sont les coupes pratiquées sur les os frais qui fournissent les préparations les plus instructives. Un fragment de fémur aussi frais que possible, et de très petite dimension est placé dans l'alcool pendant quelques heures, après quoi on le transporte dans un grand bocal (un litre au moins), contenant une solution saturée d'acide picrique à laquelle on ajoute 2 p. 100 d'acide azotique. Ce liquide doit être renouvelé le jour suivant. Si le fragment d'os est très petit, et c'est là une condition inspensable de succès, la décalcification sera complète au bout de 3 ou 4 jours. La dissolution des sels calcaires est achevée, lorsque les fragments sont devenus extrêmement souples et se laissent facilement couper avec le scalpel. Après quoi on les fait séjourner dans une grande quantité d'eau qu'on renouvelle jusqu'à ce que la pièce ait été entièrement débarrassée de l'acide. On durcit par l'action successive de la gomme et de l'alcool. Les coupes pratiquées suivant les différents diamètres de l'os sont lavées jusqu'à disparition de la couleur jaune, colorées au picro-carmin et montées dans l'eau phéniquée ou dans la glycérine (1).

Cette méthode convenant admirablement pour l'étude de l'*ossification*, nous n'ajouterons que quelques détails complémentaires. L'objet d'étude est fourni par le fémur d'un embryon humain de cinq à six

(1) On peut obtenir des préparations comparables à celles que l'on fait avec des coupes d'os sec colorés au bleu d'aniline en traitant une coupe pratiquée après décalcification, par le carmin acétique de Schweiger-Seidel. Cette teinture n'est autre chose que du carmin ammoniacal neutralisé par l'acide acétique.

Carmin.	2 gr.
Ammoniaque.	4 gr.
Eau.	100 gr.

Faire dissoudre le carmin dans l'ammoniaque et dans l'eau. Ajouter de l'acide acétique en agitant jusqu'à ce qu'un précipité commence à se produire. Filtrer. Les coupes bien débarrassées de l'acide picrique sont placées dans cette solution pendant 24 heures. Monter dans la glycérine additionnée de quelques gouttes de la teinture. Les corpuscules et leurs prolongements sont colorés en rouge.

mois (ossification enchondrale) et par les tendons ossifiés de la patte des oiseaux (ossification fibreuse). Les coupes pratiquées dans le sens transversal et longitudinal seront colorées par des teintures variées. On choisira de préférence : le picro-carmin ; la purpurine ; l'hématoxyline ; le bleu de quinoléine (1). On conservera les préparations dans la glycérine ou dans l'eau phéniquée.

On complètera l'étude technique de l'ossification par l'examen de préparations permettant de se rendre compte du rôle que jouent les vaisseaux dans la genèse de l'os. Dans ce but on injecte le système artériel d'un jeune chat avec une masse de gélatine au bleu de Prusse, on enlève un fémur que l'on fixe par une séjour d'une semaine dans le bichromate d'ammoniaque à 2 p. 100. Après quoi on décalcifie dans une solution aqueuse d'acide picrique. Lavages prolongés ; durcissement par l'action successive de la gomme et de l'alcool. Coupes parallèles au grand axe de l'os. Conservation dans la résine dammar.

§ 3. — EXAMEN DE LA MOELLE OSSEUSE ET DU PÉRIOSTE

Il n'est pas besoin de préparation spéciale pour l'examen du périoste, les coupes, faites après décalcification, sur un fragment pris à la périphérie d'un os montrent tous les détails désirables. Pour prendre connaissance des éléments de la moelle, extraire le fémur d'un jeune cobaye, le casser en son milieu avec les doigts. Cela fait, enlever à l'aide d'un scalpel un petit fragment de moelle qu'on dissocie *rapidement* sur une lame sans employer de liquide. Exposer aux vapeurs d'acide osmique, colorer au picro-carmin. Cette méthode permet de voir les globules rouges nucléés de la moelle embryonnaire ; on pourrait également faire macérer pendant 24 heures un fragment de moelle dans l'alcool au 1/3 et le dilacérer en l'agitant dans un petit tube. (Voir les méthodes de dissociation.)

(1) Ce réactif colore l'os en bleu clair et le cartilage en violet foncé. M. Ranvier le considère comme le réactif par excellence du tissu cartilagineux. Il convient encore de mentionner la coloration par le violet d'aniline suivant la méthode de Baumgarten. Colorer les coupes quelques minutes dans une solution aqueuse de bleu. Laver, dans l'eau légèrement acidulée jusqu'à ce que la couleur violette vire au bleu d'aniline. Laver à l'eau pure et examiner dans l'eau. Le cartilage est bleu, le cartilage calcifié est violet ou rose, le tissu osseux est rouge.

CHAPITRE QUATRIÈME

TISSU MUSCULAIRE

§ 1. — TISSU MUSCULAIRE STRIÉ

Pour étudier les différents éléments (*sarcolemme*, *noyaux*, *fibrilles*, etc.), qui entrent dans la composition du tissu musculaire strié il est indispensable de s'adresser à des animaux différents parce que certains détails de structure sont plus facilement appréciables dans une espèce que dans l'autre. Nous choisirons : la grenouille, l'hydrophile et un animal mammifère.

Sarcolemme. — Dissocier dans l'eau un fragment de muscle enlevé au couturier de la grenouille (1) au bout de quelques minutes l'eau pénètre par endosmose sous le sarcolemme et le soulève par places. On peut rendre la membrane plus évidente en ajoutant une goutte de la solution d'iode iodurée qui la colore en jaune. On se servira pour dissocier soit des pinces, soit des aiguilles et on agira brutalement. On obtient ainsi des faisceaux dans lesquels la substance striée s'est rompue dans l'intérieur de la membrane et a laissé, entre ses deux bouts, un espace vide au niveau duquel le sarcolemme est très apparent.

Voici une formule pour la préparation de la solution d'iode iodurée :

Eau distillée..........	100
Iodure de potassium....................	6
Iode....................................	4

Étendre avec de l'eau distillée si la coloration produite est trop intense.

(1) Ce muscle, formé de faisceaux parallèles entre eux, convient pour les dissociations et pour les coupes qui peuvent être facilement orientées.

Faisceaux musculaires : noyaux. — Deux procédés nous permettront de faire une étude plus complète des faisceaux musculaires : la dissociation par la *potasse à 40 p. 100* et la dissociation après macération dans l'*alcool au tiers* ou dans le *sérum iodé.*

Si l'on place un fragment de muscle sur un porte-objet et qu'on ajoute une goutte de la solution de potasse à 40 pour 100, il suffit d'appliquer légèrement les aiguilles pour obtenir des faisceaux admirablement isolés. Cette préparation est extrêmement facile à obtenir mais elle ne se conserve pas, on doit examiner les faisceaux dans la solution dissociatrice.

Les dissociations pratiquées après macération dans l'*alcool au tiers* fournissent des préparations *permanentes*. On écorche une grenouille et on place l'un des membres inférieurs dans un grand flacon plein d'alcool au tiers. Les muscles sont ainsi fixés à l'état d'extension leurs deux insertions ayant été laissées intactes. Après 24 heures, enlever un fragment du couturier que l'on dissocie sur une lame en ayant recours au procédé de la demi-dessiccation. Colorer au picro-carminate pendant dix minutes, recouvrir d'une lamelle. Laver légèrement en faisant passer sous la lamelle une goutte ou deux d'eau filtrée qu'on remplace par de la glycérine formique.

Fibrilles musculaires. — Les fibrilles musculaires des insectes montrent, d'une façon extrêmement élégante, la striation transversale de la substance contractile. On choisit un insecte coléoptère (*hanneton, hydrophile, ditique,* etc.) auquel on enlève une de ses élytres ainsi que l'aile membraneuse correspondante. On incise avec des ciseaux forts le protothorax de façon à l'ouvrir largement et à mettre à nu les muscles alaires qui apparaissent sous la forme d'une masse blanchâtre. Placer le tout dans l'alcool au tiers pendant 24 heures. Puis à l'aide des ciseaux courbes, on enlève un fragment de ces muscles que l'on dissocie sur une lame en se servant du procédé de la demi-dessiccation. Colorer fortement par l'*hématoxyline de Bœhmer* préparée depuis longtemps. Monter dans la résine dammar.

Coupes. — Pour étudier les rapports des faisceaux musculaires, on aura recours à la méthode des coupes. Il faut pour obtenir de bonnes préparations, maintenir le muscle dans son extension naturelle pendant qu'on fait agir le réactif fixateur et choisir un muscle dont les faisceaux soient parallèles entre eux. Nous conseillons de prendre le

muscle couturier. On place le train postérieur de la grenouille débarrassée de sa peau, dans la solution de bichromate à 2 p. 100. Au bout de 10 jours enlever le muscle, laver comme il a été dit plus haut, et durcir par l'action successive de la gomme et de l'alcool (1). Colorer les coupes par l'hématoxyline et l'éosine et conserver dans la résine. On peut également placer le train postérieur d'un rat dans le bichromate, mais il est préférable de tendre le muscle couturier, enlevé à un sujet que l'on vient de sacrifier, sur une plaque de liège que l'on fait flotter sur le liquide fixateur. Pour le reste agir comme pour le couturier de la grenouille. Il est indispensable de faire des coupes d'un muscle de la *grenouille* et d'un muscle de *mammifère,* parce que la disposition des noyaux y est différente (2).

Pour voir les *disques de Bowmann,* on peut faire macérer un petit muscle dans de l'acide acétique dilué (1 c. c. d'acide acétique pour 400 gr. d'eau) et dissocier sur une lame à l'aide des aiguilles ; mais il est plus commode d'employer la technique indiquée par le professeur Ranvier. Enlever un muscle à un mammifère que l'on vient de sacrifier et le coucher sur la boîte à congélation du microtome Malassez parallèlement à l'axe de ses faisceaux. Les coupes faites par le procédé de congélation au chlorure de méthyle doivent être très minces et bien orientées dans le sens longitudinal. On les dissocie, sur une lame, dans une goutte de picro-carmin.

Vaisseaux des muscles striés. — Injecter un animal avec une masse au bleu de Prusse comme il sera dit plus haut, choisir un muscle à faisceaux bien parallèles et faire des coupes longitudinales et transversales après fixation par le bichromate et durcissement par l'action successive de la gomme et de l'alcool; conserver dans la résine dammar. On pourrait, au lieu de faire des coupes, prendre un muscle mince et transparent de la grenouille (*un muscle de l'abdomen*) l'étaler sur une lame et le monter à plat dans la résine dammar.

Terminaisons nerveuses dans les muscles. — On devra étudier les terminaisons nerveuses des muscles chez les *articulés,* chez les *batraciens anoures* et chez les *mammifères* ou les *reptiles.* On choisira de préférence la grenouille et le lézard.

Chez une *grenouille* que l'on vient de sacrifier on enlève un muscle

(1) On fera des coupes longitudinales et transversales. Ces dernières sont les plus instructives.

(2) Voir RANVIER. Traité technique.

peaucier que l'on tend sur un petit fragment de liège avec des piquants de hérisson. On les place pendant cinq minutes dans du jus de citron fraîchement exprimé et filtré sur de la flanelle, on lave rapidement et on porte le muscle dans une solution de chlorure d'or à 1 p. 100 (vingt minutes). Laver de nouveau pendant une seconde, réduire à l'obscurité dans l'acide formique au quart. Le lendemain, la réduction étant complète, on peut monter le petit muscle dans la glycérine formique.

Pour étudier les plaques motrices du *lézard*, on enlève à l'aide des ciseaux courbes un fragment d'un muscle quelconque que l'on traite par le *jus de citron* et par le *chlorure d'or* comme il a été dit pour le muscle peaucier de la grenouille. Dissocier sur une lame et monter dans la glycérine formique. On peut encore employer le procédé suivant : Mélanger 4 *parties de chlorure* d'or avec 1 *partie d'acide formique*. Faire *bouillir* et laisser refroidir. Placer un petit fragment de muscle dans 2 c. c. de chlorure d'or pur et ajouter peu à peu quelques c. c. d'or bouilli avec l'acide formique. Réduire dans l'acide formique au quart :

Eau distillée……………………	4
Acide formique…………………	1

Dissocier sur une lame et monter dans la glycérine formique. Ces procédés (jus de citron et or bouilli), qui fournissent des résultats remarquables sont dus, tous les deux, au professeur Ranvier (1).

§ 2. — TISSU MUSCULAIRE LISSE

Il n'y a pas d'objet d'étude plus élégant et plus commode pour l'étude des fibres lisses que la *vessie de la grenouille*. Après avoir immobilisé une grenouille par la section du bulbe placer une forte

(1) Il existe une expérience classique de Ranvier pour étudier l'union des muscles et des tendons que tout jeune histologiste doit répéter. On plonge dans de l'eau chauffée à 55° C. une grenouille vivante que l'on y abandonne pendant 20 minutes. Lorsque l'on enlève la grenouille du bain qui s'est lentement refroidi elle est entièrement rigide. Il suffit d'exercer une légère traction sur la peau pour l'enlever ; les muscles se dissocient avec une facilité surprenante et si l'on dissocie un faisceau adhérent à son tendon, en ayant soin d'appliquer les aiguilles sur ce dernier, on voit que le sarcolemme reste adhérent aux fibres tendineuses, tandis que la substance musculaire s'en est détachée et s'est retirée dans sa gaine.

ligature sur l'orifice du cloaque, ouvrir la cavité abdominale à sa partie inférieure, chercher l'extrémité supérieure du rectum que l'on sectionne. Introduire la canule d'une seringue, chargée d'alcool au 1/3 ou de bichromate d'ammoniaque, dans le bout inférieur de l'intestin et pousser doucement le piston. La matière à injection pénètre dans la cavité du cloaque ou elle est maintenue par la ligature et remonte dans la vessie quelle distend. On s'arrête avant que la tension soit suffisante pour produire une rupture de la vessie. Placer, ensuite, une ligature au-dessous de la canule, réséquer en une seule pièce la vessie, le rectum, et les membres postérieurs que l'on abandonne jusqu'au lendemain dans un cristallisoir rempli du liquide qui a servi à faire l'injection. On enlève la vessie, fixée à l'état d'extension, on la fend puis on la tend au fond d'un cristallisoir plein d'eau la face interne en haut et on brosse avec un pinceau jusqu'à ce que tout l'épithélium ait été enlevé. On la porte alors sur une lame de verre sur laquelle on l'étend, la face interne en haut, en se servant du procédé de la demi-dessiccation. Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine, conservation dans la résine dammar.

Dissociation du tissu musculaire lisse. — La préparation précédente permet d'observer des cellules musculaires lisses presque entièrement isolées ainsi que des cellules réunies en faisceaux. Il convient cependant de compléter les renseignements qu'elle fournit, par l'emploi de quelques autres méthodes.

Un fragment de tissu enlevé avec des ciseaux courbes à la tunique musculeuse de l'intestin est placé dans une goutte de *potasse à 40 p. 100.* Au bout de quelques minutes on dissocie avec des aiguilles. Recouvrir d'une lamelle et examiner dans la potasse. Cette préparation ne se garde pas.

Pour avoir des préparations permanentes de cellules musculaires entièrement dissociées, il convient d'avoir recours au procédé suivant : On résèque, sur un lapin, une anse d'intestin grêle qu'on ferme à un bout avec une ligature ; par l'autre bout, on injecte une solution de bichromate d'ammoniaque à 2 p. 100. Lorsque l'anse est suffisamment distendue on place une ligature au-dessous de la canule et on la porte dans un bain de la même solution où on l'abandonne pendant un ou deux jours (1). On fend ensuite l'anse intestinale et on la lave dans

(1) RANVIER. Traité technique.

l'eau que l'on renouvelle plusieurs fois (24 heures). A l'aide des pinces on arrache facilement un fragment de la musculeuse que l'on dissocie sur une lame dans une goutte d'eau. Coloration au picro-carmin dans la chambre humide (12 heures) conservation dans la glycérine. Si l'on veut bien observer les noyaux on remplacera le picro-carmin par le carmin aluné qu'on fera agir pendant une ou deux heures.

Coupes de muscles lisses. — Fixer une anse intestinale par de l'alcool fort en la remplissant comme il a été dit pour la préparation précédente. Durcir par l'action successive de la gomme et de l'alcool. Coloration par le picro-carminate, conservation dans la glycérine.

Vaisseaux des muscles lisses. — Sur un lapin dont on a injecté le système vasculaire avec une masse au bleu de Prusse on resèque une anse d'intestin grêle que l'on place dans une solution de bichromate à 2 pour 100. Après un jour ou deux de macération on enlève à l'aide du scalpel et de la pince un fragment aussi mince que possible de la tunique musculeuse. Laver, colorer avec l'hématoxyline de Ranvier. Examiner à plat dans la résine dammar.

Nerfs des muscles lisses. — C'est à la vessie de la grenouille qu'il faut s'adresser pour obtenir une préparation démonstrative des terminaisons nerveuses dans les muscles lisses. Le procédé est extrêmement simple : On distend avec du chlorure d'or bouilli avec de l'acide formique la vessie d'une grenouille en employant le procédé indiqué plus haut. On place une ligature et on enlève la vessie que l'on abandonne pendant 25 minutes dans la solution d'or. Puis on fend la vessie, on la lave dans l'eau distillée et on réduit à l'obscurité dans l'acide formique au quart (24 heures). Etendre la membrane, la face interne en haut, brosser légèrement au pinceau pour chasser l'épithélium, monter dans la glycérine formique (1).

Pour terminer l'étude des tissus, nous aurons encore à passer en revue les procédés techniques employés pour déterminer la structure des épithéliums et du tissu nerveux. Les *épithéliums* de revêtement et les *glandes* trouveront leur place dans la description que nous ferons des différents organes de l'économie, les *éléments nerveux* seront étudiés avec plus de fruit quand nous aborderons l'étude du système nerveux.

(1) On peut activer la réduction en chauffant l'eau acidulée dans laquelle est placée la pièce. — HENOCQUE. Distribution des nerfs dans les muscles lisses.

CHAPITRE CINQUIÈME

DE LA LYMPHE

On doit commencer cette étude par l'examen de la lymphe d'un vertébré à sang froid nous choisirons la grenouille que l'on trouve partout en abondance.

§ 1. — MOYEN DE RECUEILLIR LA LYMPHE

Le procédé, le plus simple, pour recueillir la lymphe chez la grenouille consiste à l'aspirer dans le sac lymphatique dorsal à l'aide d'une pipette à pointe très effilée. Prendre un sujet vigoureux sortant de l'eau, ficeler ses pattes antérieures et postérieures afin de l'immobiliser et essuyer soigneusement la peau du dos. Exercer à l'aide des doigts de la main gauche une compression sur la région dorsale de façon à ramener la lymphe vers un point déterminé. Cela fait, enfoncer d'un mouvement brusque la pointe de la pipette qui se remplit en partie, achever de puiser la lymphe en aspirant.

On peut encore curariser une grenouille et prendre la lymphe dans le sac lymphatique dorsal. Par le fait de la curarisation, les sacs lymphatiques se remplissent d'une quantité telle de lymphe que la langue arrive à faire saillie hors de la bouche. Pour avoir de la lymphe piquer ce sac avec une pipette à pointe effilée.

§ 2. — PRÉPARATION D'UNE GOUTTE DE LYMPHE

Voyons maintenant quels sont les préparations que l'on doit faire avec la lymphe ainsi obtenue.

a. — Une goutte de lymphe est placée sur une lame porte-objet.

Exposer aux vapeurs d'acide osmique (5 minutes), colorer au carmin aluné, couvrir d'une lamelle, conserver dans la glycérine neutre que l'on substitue lentement au carmin aluné. Cette préparation montre d'une façon remarquable les formes variées des noyaux. Si l'action de l'osmium a été prolongée, les granulations graisseuses, que l'on trouve dans les globules blancs, sont colorées en noir.

b. — Une goutte de lymphe est placée sur une lame, couvrir d'une lamelle sous laquelle on fait passer du sérum fortement iodé ou de la solution d'iode iodurée. Les globules lymphatiques se colorent en brun acajou. Un certain nombre d'entre eux laissent échapper des boules sarcodiques présentant cette coloration que l'on considère comme caractéristique de la substance glycogène.

c. — Dans une troisième préparation, on étudiera l'action de l'eau sur les cellules lymphatiques. Ces globules examinés dans le sérum, apparaissent uniformément granuleux et ne laissent pas voir leurs noyaux. Si l'on fait arriver de l'eau sous la lamelle, le protoplasma se gonfle, devient transparent ; le noyau devient apparent et montre ses formes bizarres.

§ 3. — EXAMEN DES PROPRIÉTÉS MIGRATRICES

Il existe un grand nombre d'expériences faites pour démontrer les propriétés migratrices des globules blancs ; nous décrirons seulement celles qui, tout en étant démonstratives, nous paraissent faciles à répéter.

a. — Tailler un petit cylindre de moelle de sureau que l'on introduit dans le sac dorsal d'une grenouille. Retirer le cylindre au bout de 24 heures et le fixer par les vapeurs d'acide osmique. Couper perpendiculairement à la base du cylindre, et examiner dans l'eau. Pour rendre la préparation persistante, colorer au carmin aluné et monter dans la glycérine. Les cellules des couches superficielles présentent seules des expansions amiboïdes ; celles des parties centrales sont revenues à la forme ronde et ont subi la dégénérescence graisseuse ; ce sont des éléments morts, analogues aux globules du pus. Cette expérience prouve que l'oxygène est nécessaire à l'activité amiboïde des cellules lymphatiques ; là où ce gaz fait défaut

(au centre du bâton de moelle), l'activité amiboïde s'arrête et la cellule meurt (Ranvier, *Traité technique*).

b. — L'absorption des matières pulvérulentes par les globules blancs, représente une modalité de l'activité amiboïde que l'on observera dans l'expérience suivante. Triturer, dans un peu d'eau, du vermillon ou du bleu d'aniline insoluble dans l'eau jusqu'à ce que la matière colorante soit réduite en poudre impalpable. Injecter, dans le sac dorsal de la grenouille, un centimètre cube d'eau à laquelle on aura ajouté une petite quantité de la solution précédente (1). Au bout de quelques heures, les cellules lymphatiques du sac dorsal, présentent des granulations de matière colorante.

c. — C'est en examinant les globules blancs dans leur propre plasma, après avoir déposé une goutte de lymphe dans la chambre humide porte-objet, que l'on observera les mouvements amiboïdes dans leur plus grand développement. L'expérience est relativement longue, aussi, il convient de fixer la lamelle à l'aide d'une bordure de paraffine qui empêche l'évaporation. Il faut employer un grossissement de 300 diamètres, et fixer spécialement un globule parmi ceux qui occupent le champ du microscope. Nous conseillons de dessiner à la chambre claire, les contours de la cellule, au commencement de l'observation, et de refaire plusieurs fois le dessin du même élément, en espaçant chaque examen de cinq en cinq minutes. En comparant les images, on se rendra mieux compte des modifications qui surviennent dans la forme et dans les dimensions de la cellule. Si on examine cette même préparation au bout de trente-six heures, on voit que les cellules lymphatiques sont revenues à la forme ronde et ne sont plus le siège d'aucun mouvement amiboïde. Il suffit d'enlever la bordure de paraffine et de soulever la lamelle de manière à introduire un peu d'air pour voir les mouvements amiboïdes recommencer (Ranvier). Si on porte la préparation précédente sur la platine chauffante, on constate que les mouvements amiboïdes sont activés entre 10° et 20°. A une température plus élevée (42°), les cellules lymphatiques sont frappées d'inertie.

Nous avons peu de chose à ajouter sur l'examen des globules blancs des *vertébrés à sang chaud.* On puisera la lymphe chez le lapin dans les parties déclives de l'une des séreuses viscérales, le péricarde, la

(1) Pour parler exactement, la matière colorante n'est pas en solution, mais en suspension dans l'eau.

plèvre ou le péritoine. On se servira d'une pipette mousse et on aura bien soin de ne point la mélanger à du sang. C'est pour ce motif qu'il faut employer le fer rouge pour faire les incisions destinées à conduire la pipette dans ces cavités (1).

Les observations que nous avons conseillées de faire sur la lymphe de la grenouille seront minutieusement reproduites. Il faut seulement remarquer que l'activité amiboïde ne s'exerce qu'à une température voisine de celle de l'animal. Les globules du lapin commençent à montrer des prolongements à 20° C. mais c'est à 33° que leur activité est à son maximum (Ranvier) (2).

(1) On se servira du thermocautère ou à défaut de cet instrument d'une tige en fer que l'on chauffera au *rouge sombre* à l'aide d'un bec Bunsen.

(2) Nous reproduisons plus loin l'expérience de Conheim qui fournit un exemple remarquable de l'activité migratrice des globules blancs.

CHAPITRE SIXIÈME

DU SANG

§ 1. — MANIÈRE DE SE PROCURER DU SANG

Il n'est pas besoin d'une grande quantité de sang pour examiner ce tissu au microscope : quelques gouttes suffisent pour obtenir un grand nombre de préparations sur lesquelles on peut observer à loisir les réactions micro-chimiques des globules rouges. Pour se procurer du sang de l'homme il suffit de piquer l'extrémité du doigt avec une aiguille flambée en ayant soin d'exercer une légère compression au-dessus de la piqûre. Chez le chien et le lapin on piquera l'oreille ou la pulpe des pattes. Ce procédé n'est pas applicable à la grenouille parce que le sang serait mélangé à une quantité considérable de lymphe ; il vaut mieux employer la méthode suivante :

Immobiliser une grenouille par la piqûre du bulbe, essuyer soigneusement l'animal et inciser les téguments au niveau de l'appendice xyphoïde du sternum. Lorsque le péricarde a été mis à nu, tendre cette séreuse, et réséquer la pointe du cœur préalablement tiré au dehors à l'aide des pinces. Il suffit de placer l'animal au-dessus d'une lame porte-objet ou d'un verre de montre pour obtenir une certaine quantité de sang à peu près pur.

§ 2. — EXAMEN DU SANG VIVANT

Dans une première série de préparations, on examinera les éléments du sang vivant placés dans leur propre plasma. Déposer une goutte de sang, obtenue comme il a été dit plus haut, sur une lame bien propre, couvrir d'une lamelle et mettre une bordure de paraffine pour em-

pêcher l'évaporation. Cette préparation faite successivement avec du sang de mammifère et avec du sang de grenouille, montrera la différence de forme des globules rouges (1). En examinant pendant quelques minutes on verra se produire l'*empilement des globules* à la façon des pièces de monnaies. Au bout d'un certain temps, la plupart des globules perdent leur forme, deviennent irréguliers sur leurs bords ce sont des *globules crénelés.*

Pour faire agir les réactifs sur les globules rouges il est bon d'employer le dispositif suivant : on place une goutte de sang sur une lame de verre, et on couvre d'une lamelle qu'on fixe à ses quatre angles à l'aide d'une goutte de paraffine. Cela fait on dépose une goutte de réactif sur l'un des bords de la lamelle et on aspire sur l'autre bord à l'aide d'une languette de papier buvard. On étudie ainsi l'action de l'*eau* et de la *bile.*

On peut se servir d'*eau pure* ou mieux d'eau chargée d'une très faible quantité d'*éosine* (Renaut), on observe sur cette préparation la *déformation* et la *décoloration* des globules qui prennent la forme sphérique. Si l'on fait l'expérience sur des globules de grenouille, on assiste à la sortie du noyau et à la déformation dite *retournement en calotte,* le globule ressemble à une balle de caoutchouc que l'on aurait déprimée d'un côté. Quand l'action de l'eau à été suffisamment prolongée, les globules sont devenus invisibles, on dirait qu'ils se sont dissous dans le liquide. En réalité le protoplasma s'est tellement gonflé que sa transparence est devenue trop grande, on peut les rendre de nouveau visibles en faisant passer sous la lamelle une substance avide d'eau de la glycérine éosinée par exemple (Renaut).

On obtient facilement une petite quantité de *bile* en enlevant la vésicule biliaire d'une grenouille que l'on vient de sacrifier. La bile dissout entièrement les globules rouges.

On étudiera, ensuite, l'action de la *chaleur* sur les globules en employant le procédé, si commode, du professeur Ranvier. On touche, avec une barre d'étain chauffée jusqu'à ce que son extrémité subisse un commencement de fusion, une lame de verre sur la face opposée de laquelle on a placé une goutte de sang en ayant soin d'établir le contact à l'endroit qui répond au centre de la goutte. On examine les différentes zones de la goutte en s'éloignant progressivement du

(1) Ce que nous avons dit des cellules de la lymphe est applicable aux globules blancs du sang.

point central (1), on peut encore, suivant la méthode de Max. Schultze placer une préparation de sang sur la platine chauffante qu'on porte à une température de 65°. Tous les globules se dissolvent dans le plasma.

§ 3. — PRÉPARATIONS PERMANENTES DU SANG

Après cette étude expérimentale des propriétés du globule rouge on fera quelques *préparations permanentes* du sang. Nous indiquerons deux procédés de fixation qui fournissent, tous les deux, des résultats remarquables : la *chaleur* et l'*acide osmique en vapeurs*.

Étaler à l'aide d'une baguette de verre, promenée à plat sur la lame, une goutte de sang que l'on réduit ainsi en une couche *aussi mince que possible*. Passer la lame, à plusieurs reprises, sur la flamme d'une lampe à alcool jusqu'à dessiccation complète. Les globules fixés dans leur forme et dans leurs dimensions naturelles, adhèrent à la lame.

Placer une mince couche de sang sur un porte-objet que l'on expose pendant dix minutes aux *vapeurs d'acide osmique* en le retournant sur un flacon à large ouverture. On pourrait encore employer l'osmium à l'état de solution en mélangeant une goutte de sang à une goutte d'acide osmique à 1 p. 100.

Les globules de la grenouille fixés par l'action de la chaleur, peuvent être teints à l'aide de l'éosine et du vert de méthyle. On colore pendant trois minutes avec quelques gouttes de la teinture suivante :

Éosine	2
Eau	50
Alcool	50

Faire dissoudre l'éosine dans l'eau et ajouter l'alcool.

Laver légèrement et colorer pendant deux minutes avec une solution aqueuse de *vert de méthyle*. Laver, faire sécher et conserver dans la

(1) On voit dans cette préparation : au centre, une zone dans laquelle les globules ont été dissous; plus en dehors, une zone où les globules ont expulsé leur noyau ; plus en dehors encore, une zone de globules déformés, retournés en calotte ou crénelés.

résinc après avoir éclairei par l'essenec de bergamotc. Les globules sont colorés cn rouge, les noyaux et les leueoeytcs en vert.

Lcs globules de la grenouille, fixés par les vapeurs d'osmium, peuvent être colorés par le même proeédé; les globulcs de l'homme traités par l'osmium seront eolorés avee une solution faible d'éosine. Sous l'influence de ee réaetif, ils prennent une teinte rouge brique earaetéristiquc de l'hémoglobinc (Fiseher).

Quand on veut eonserver les globules rougcs dans un tissu destiné à être débité en coupcs, il faut avoir soin d'employer, comme fixatcur, l'*acide picrique* ou lc *bichromate* d'*ammoniaque* à 2 p. 0/0. Après l'action de l'un de ees réaetifs on pourra achever le durcissement par l'aetion suceessive de la *gomme* et de l'*alcool*, sans que les globules rouges soient altérés, ce qui ne manquerait pas d'arriver si on fixait le tissu simplement par l'aleool. Comme réaetif colorant, nous conseillons l'*hématoxyline* et l'*éosine*, les coupes seront conscrvées dans la résine dammar.

§ 4. — CRISTAUX D'HÉMOGLOBINE

Il est indispcnsable de faire une préparation des eristaux d'*hémoglobine* et d'*hémine*.

On doit examincr l'*hémoglobine* chez plusieurs espèees animales, paree que lcs cristaux présentent des formes différentes; eepcndant on n'obtiendra de bons résultats qu'avee du sang pris sur des animaux chez lesquels l'hémoglobine cristallise faeilement (*cobaye* et *chien*). Voiei deux proeédés extrêmement commodes pour faire une préparation mieroscopique d'hémoglobinc.

« On ouvre le vaisscau dorsal d'une sangsue offieinale gorgée de sang depuis deux ou trois jours. On prcnd, avee une pipette, une goutte de lymphe que l'on dépose sur une lame. En conservant la préparation dans la ehambre humide et en la laissant ensuite se desséeher bien lcntement, on obtient d'immenses aiguilles cristallines rouges se terminant en pointe enchevêtrées les unes dans les autres (Rcnaut).

On peut eneore opérer de la manière suivantc : on plaee une goutte de sang défibriné sur le porte-objet et on la laisse évaporcr jusqu'à ce que les bords eommencent à sc dessécher; on déposc cnsuite, au cen-

tre, une goutte d'eau et on couvre le tout avec la lamelle de verre. Le liquide déborde ainsi au delà de l'anneau d'abord formé et les cristaux ne tardent pas à se montrer (Wurtz, *Chimie biologique*).

La recherche de l'*hémine* présente une certaine importance, parce que c'est elle qui sert, en médecine légale, à reconnaître les taches de sang. On place une goutte de sang sur une lame et on ajoute une parcelle de chlorure de sodium, puis une goutte d'acide acétique glacial. On chauffe pendant quelques instants au dessus de la lampe à alcool, jusqu'à ce qu'il commence à se former des bulles de gaz. On laisse refroidir et on examine les bords desséchés de la goutte à l'aide d'un fort grossissement.

§ 5. — FIBRINE

Il est bon, après avoir étudié les globules et la matière colorante du sang, d'observer les phénomènes microscopiques de la coagulation du plasma.

L'expérience de Schäfer est très instructive à ce point de vue : Un tube capillaire, à parois très minces, ayant été rempli de sang en piquant directement une artère de la grenouille, on place ce tube sur la platine du microscope, et on examine à un fort grossissement : « Au début les globules rouges remplissent la lumière du tube. Au bout de quelques minutes, on voit que la coagulation s'est effectuée, et que la masse cylindrique, dans laquelle sont emprisonnés les globules, est séparée du verre par un espace transparent qui ne renferme aucun globule. Puis les globules blancs commencent à sortir du coagulum et nagent dans le sérum. En voyant l'activité des mouvements amiboïdes des globules, on serait tenté de leur attribuer la sortie de ces éléments anatomiques hors du caillot, mais ce n'est là qu'une fausse apparence comme le démontre ce qui suit. Peu de temps après (d'ordinaire environ quarante-cinq minutes après le début de l'observation), les globules rouges commencent à présenter le même phénomène. Ils s'échappent en si grand nombre des bords toujours très nets du caillot, que le liquide en est bientôt rempli et que l'examen microscopique n'est plus possible. Si on enlève maintenant le tube de dessus la platine du microscope, et qu'on le place verticalement, on voit, au bout de quelque temps, les globules se déposer au fond en laissant au des-

sus d'eux un espace clair rempli de sérum. On serait disposé de considérer ce phénomène comme une dissolution du coagulum ; mais l'apparence est trompeuse, car si l'on chasse le contenu du capillaire dans un verre de montre en soufflant fortement à l'une de ses extrémités, on voit le caillot sous la forme d'un mince cordon de fibrine flottant dans le liquide. Il ne s'agit donc pas d'une dissolution secondaire du caillot, mais de la simple coutraction du réseau de fibrine dont les mailles deviennent progressivement trop étroites pour contenir le sérum et les globules primitivement emprisonnés dans le coagulum primitif » (1).

Pour étudier le réseau de fibrine produit par la coagulation, on emploiera le procédé suivant : Une goutte de sang de grenouille ou de mammifère est placée sur une lame et abandonnée à la coagulation dans la chambre humide. Quand le sang est pris en gelée, et qu'on peut retourner la lame sans que la goutte de sang se déplace, on plonge la préparation dans un cristallisoir rempli d'eau filtrée. Bientôt la goutte de sang se décolore ; on enlève doucement la lame et on colore avec la solution d'*iode iodurée* ou avec l'*éosine*. Couvrir d'une lamelle et examiner dans la solution colorante. Les préparations colorées avec l'iode, ne se conservent pas ; si on vent rendre persistante la préparation colorée par l'éosine, on fait passer sous la lamelle une goutte de glycérine salée légèrement éosinée (2).

§ 6. — NUMÉRATION DES GLOBULES

Nous terminerons l'étude technique du sang par la description de deux méthodes employées pour la numération des globules du sang : la méthode du Dr *Malassez* et celle du Dr *Hayem*.

Méthode du Dr Malassez. — Les appareils dont on se sert dans cette méthode sont au nombre de deux : Une pipette graduée ou *mélangeur Potain* et une *chambre humide graduée*.

Le *mélangeur Potain* se compose d'un tube de verre de calibre très étroit dans lequel on peut distinguer trois parties : le *tube de*

(1) BURDON SANDERSON. Laboratoire de physiologie.

(2) La glycérine salée qui conserve fort longtemps les couleurs d'aniline, se prépare de la manière suivante : Agiter 40 grammes de glycérine avec un excès de chlorure de sodium. Laisser déposer et décanter.

prise allongé et terminé en pointe ; le *réservoir* ayant la forme d'une ampoule dans laquelle se trouve une *petite boule* en verre parfaitement mobile ; le tube d'*aspiration* auquel on adapte un petit



FIG. 16. — Mélangeur POTAIN.

Les divisions 1 et 101 indiquent les points de repaire pour obtenir une dilution au centième. Si l'on veut avoir une solution au deux centième, au trois centième, etc., on ne prend du sang que jusqu'aux traits 2, 3, 4, etc., et on achève de remplir avec du sérum artificiel.

tuyau de caoutchouc. Cet appareil est gradué de telle sorte que le réservoir présente une capacité cent fois plus grande que l'étendue du tube de prise depuis l'ampoule jusqu'à l'extrémité de la pointe. Un

trait placé de chaque côté du réservoir, indique exactement le point où les proportions se trouvent exactes.

La *chambre humide graduée* du Dr Malassez est formée d'une lame métallique au milieu de laquelle se trouve une ouverture dans laquelle on a serti un disque de verre. En dehors de ce disque se trouvent trois vis dont la pointe dirigée en haut fait une saillie qu'il est possible de régler mathématiquement. Sur le disque on a gravé un réseau formé de rectangles ayant 1/5 mm d'un côté et 1/25 de l'autre ce qui donne pour l'évaluation de leur surface 1/20 de millimètre carré.

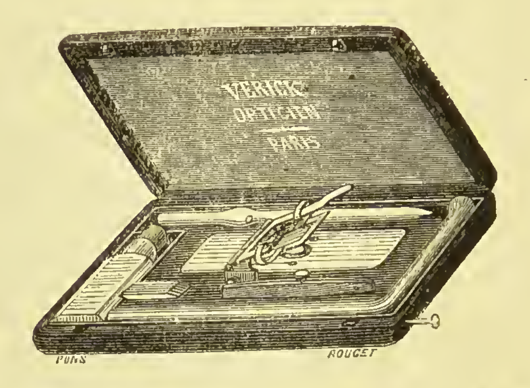


FIG. 17. — Appareil complet du Dr MALASSEZ, renfermé dans un étui.

Cinq rectangles sont subdivisés en vingt petits carrés qui serviront plus spécialement à la numération des globules rouges. Un compresseur métallique destinée à appliquer exactement une lamelle couvre-objet sur les vis, se trouve annexé à l'appareil. Quand les vis font une saillie de 1/5 de millimètre au-dessus de la lame le volume d'un liquide, placé dans un des petits rectangles, sera de 1/100 de millimètre cube.

Ceci connu voici comment il convient de procéder pour compter les globules.

Après avoir placé une ligature au niveau de la dernière phalange d'un doigt de façon à entraver la circulation de retour, on pique la peau au voisinage de l'ongle. On aspire le sang dans le mélangeur jusqu'au trait situé immédiatement au-dessous du réservoir, puis on achève de remplir ce dernier jusqu'au trait supérieur avec un sérum

artificiel destiné à diluer le sang. Le sérum employé par Malassez possède la composition suivante :

Eau	100 gr.
Sulfate de soude..........	5 gr.

Pour mélanger, on agite en tout sens l'appareil afin que la petite boule mise en mouvement brasse vivement le liquide. On obtient ainsi une dilution de sang au centième. On achève la préparation en plaçant une goutte du mélange sanguin sur la glace qu'on recouvre de la lamelle (1), qu'on maintient à l'aide du compresseur. Il est facile d'arriver à connaître le nombre des globules car ceux-ci ne tardent pas à tomber (2) sur la glace quadrillée. On compte les globules d'un rectangle en passant en revue les cinq carrés qui le forment. Comme

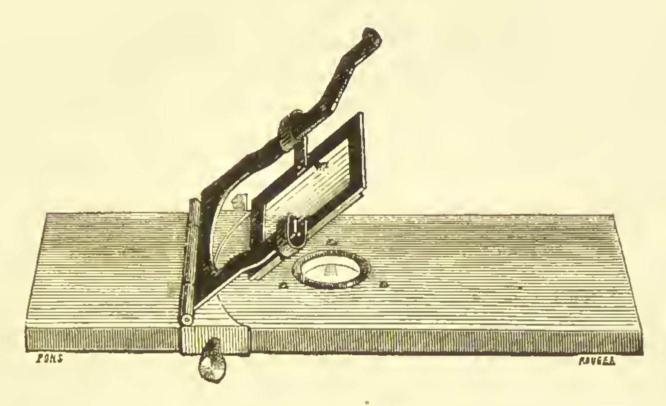


FIG. 18. — Chambre humide graduée.

l'espace représenté par le rectangle répond à 1/100 de millim. cube et que le mélange de sang est à 1/100 il faut multiplier le chiffre obtenu deux fois par 100, c'est-à-dire ajouter quatre zéros. Pour avoir un résultat plus précis on peut compter les globules dans plusieurs rectangles et prendre une moyenne. Cette observation fournit le nombre des globules rouges ; si l'on veut avoir celui des globules blancs, il faut compter les globules blancs contenus dans tous les rectangles.

(1) Le constructeur fournit des lamelles rigoureusement planes en même temps que l'appareil.

(2) Le microscope doit être placé sur un plan horizontal pour éviter l'accumulation des globules en un point de la préparation et obtenir une répartition exacte.

Ceux-ci étant au nombre de 100 répondent à un millimètre cube du mélange, il suffira donc de multiplier le nombre obtenu par le titre de la dilution (1) pour avoir le résultat cherché (2).

Le Dr *Hayem* emploie une cellule circonscrite par une lamelle de verre qui a été amincie de telle sorte que sa hauteur mesure 1/5 de millimètre.

On dilue le sang soit avec le sérum artificiel dont la composition a été indiquée plus haut, soit avec un liquide séreux, celui de l'ascite par exemple. Pour obtenir le mélange on aspire avec une pipette 2 millim. cubes de sang puis on le porte dans une petite éprouvette

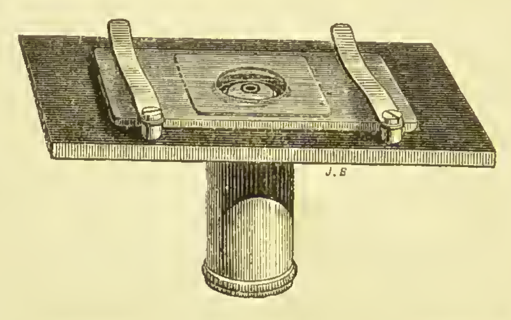


FIG. 19. — Hématimètre de M. le professeur HAYEM construit par Nachet.

contenant 500 millim. cubes de sérum. Il suffit de souffler dans le tube de caoutchouc que porte la pipette pour faire tomber le sang au fond de l'éprouvette et en aspirant deux ou trois fois de suite un peu de sérum qu'on repousse aussitôt, on vide facilement tout le tube capillaire. On introduit alors, dans la petite éprouvette contenant le sang, un agitateur terminé par une petite palette et on imprime à cette baguette de verre un mouvement de va-et-vient rapide jusqu'à ce que le mélange soit bien homogène. On dépose alors une goutte de ce mélange dans la cellule calibrée de Hayem et on couvre d'une lamelle de verre très plane que l'on unit à la cellule en mettant un peu de salive sur les bords de la préparation ; le liquide visqueux s'infiltre entre les deux plaques et s'oppose, à la fois, au glissement de la lamelle

(1) On comprend très bien que le petit nombre des globules blancs exige cette observation plus étendue.

(2) DUVAL. Technique microscopique.

et à l'évaporation du liquide. Il faut maintenant compter les globules. L'oculaire quadrillé employé primitivement a été remplacé, ces derniers temps, par la projection, sur la préparation, de l'image d'un quadrillé, formé à l'aide d'un système de lentilles placé sous la platine du microscope. Le côté de ce carré mesure 1/5 de millim. On compte les globules rouges dans plusieurs carrés et on prend la moyenne des chiffres obtenus. Il suffira de multiplier cette moyenne par 125 puis par le titre du mélange (248 dans le cas actuel) pour connaître le nombre des globules contenus dans un millimètre cube de sang (1).

(1) Le chiffre 248 représente le titre du mélange en tenant compte de la perte occasionnée par le mouillage de la pipette.

CHAPITRE SEPTIÈME

SYSTÈME CIRCULATOIRE

§ 1. — COEUR

1. **Myocarde.** — On étudiera les cellules musculaires du cœur chez la grenouille et chez un mammifère. Le meilleur moyen, pour les isoler, consiste à dissocier un fragment du myocarde enlevé à une oreillette, en se servant de la *potasse à 40 p. 100*. Ce procédé fournit des préparations admirables, mais il est impossible de les conserver. Pour avoir une préparation persistante il faut faire macérer un fragment d'oreillette dans le *sérum iodé faible*, comme il a été indiqué plus haut, et dissocier avec des aiguilles sur une lame. Coloration au picro-carminate et conservation dans la glycérine formique. On choisira un cœur de mouton pour observer les *cellules de Purkinje* et on emploiera la technique indiquée par Ranvier dans son Traité technique (page 535). On circonscrit, par deux incisions superficielles, un carré d'endocarde qu'on enlève avec un rasoir en ayant soin d'empiéter le moins possible sur le myocarde. On divise ce fragment en deux : une portion est soigneusement étendue sur un porte-objet la face interne en haut, s'il reste peu de fibres du myocarde on colore par le picro-carmin et on monte dans la glycérine; si, au contraire les fibres du myocarde existent en grand nombre et masquent les fibres de Purkinje, on s'en débarrasse à l'aide du pinceau et des pinces avant d'exécuter la préparation que nous venons d'indiquer. La seconde portion étant régulièrement étendue sur une autre lame on laisse tomber une goutte de potasse à 40 p. 100 et on couvre d'une lamelle. Il suffit d'appuyer avec une aiguille pour déterminer la dissociation des cellules qui forment les fibres de Purkinje.

On achèvera l'étude du muscle cardiaque en faisant des coupes perpendiculaires à l'axe de ses faisceaux. L'*acide picrique* et le *bichromate d'ammoniaque* conviennent très bien pour fixer ce tissu. Durcir par l'action successive de la gomme et de l'alcool. Les coupes, faites après le bichromate, seront colorées par l'*hématoxyline* et l'*éosine* et conservées dans la résine dammar. Après l'*acide picrique* colorer au *picro-carminate* et conserver dans la glycérine formique.

2. **Endocarde et valvules.** — L'endocarde sera avantageusement étudié sur des coupes du myocarde pratiquées perpendiculairement à la face interne du cœur. La pièce sera fixée et durcie par l'action successive de l'acide picrique de la gomme et de l'alcool. Coloration au picro-carmin et conservation dans la glycérine acide. Pour voir l'*endothélium* endocardique on choisira de préférence le cœur du rat ou du lapin : Injecter par l'une des veines une solution de nitrate d'argent à 1 p. 300 jusqu'à ce que le liquide revienne par les artères. Quand la face interne du cœur a été bien lavée par le sel d'argent on ouvre cet organe dans un cristallisoir rempli d'eau distillée et exposé à la lumière directe du soleil. Après quoi on enlève, à l'aide d'un rasoir en coupant parallèlement à sa surface, un fragment d'endocarde qu'on étale sur une lame la face interne en haut. Colorer au carmin aluné, laver, déshydrater par l'alcool absolu, éclaircir par l'essence de girofle et conserver dans la résine dammar.

On étudiera, par le même procédé, l'endothélium des valvules. Pour voir la disposition des couches conjonctives qui forment la charpente de ces dernières on procèdera de la manière suivante : On étend une valvule sur une plaque de liège en piquant ses bords avec des épingles et on place le tout dans une cuvette remplie d'acide picrique. Au bout de 2 heures on enlève les épingles et on achève la fixation de la valvule, qui ne se déforme plus, en la jetant directement dans le liquide fixateur (6 heures). Après quoi on durcit la valvule par l'action successive de la gomme et de l'alcool. Coupes parallèles et perpendiculaires à son axe exécutées à l'aide du microtome Ranvier. Coloration au picro-carminate. Examen dans la glycérine acide.

§ 2. — ARTÈRES

Il est indispensable de faire des préparations avec une artère appartenant au type élastique et avec une artère du type musculaire. On choisira l'*aorte* et la *fémorale* de l'homme.

Coupes. — On commencera par exécuter des coupes sur lesquelles on étudiera la disposition et la structure générale des trois tuniques. Après avoir enlevé la plus grande partie du tissu cellulaire qui double la face externe de l'aorte, on fend cette artère avec des ciseaux qu'on dirige parallèlement au grand axe du vaisseau. On en résèque un petit rectangle que l'on oriente de telle sorte que son grand côté soit perpendiculaire à la lumière du vaisseau. Ce sera un moyen de se rappeler plus tard dans quels sens on doit orienter les coupes. Si l'on veut des coupes parallèles à l'axe de l'artère on sectionnera parallèlement au petit côté; si, au contraire, on veut des coupes perpendiculaires on portera le rasoir parallèlement au grand côté. Cette recommandation, qui semble puérile, présente une grande importance, car si l'on coupait un morceau quelconque de l'artère on oublierait fatalement dans quel sens la section a été faite. Par suite, les coupes, mal orientées, ne fourniraient que des résultats médiocres. On traitera l'artère comme il a été dit pour les valvules. (Fixation par l'acide picrique après extension sur du liège; durcissement par la gomme et l'alcool.) Les coupes exécutées au microtome Ranvier (1) seront fortement colorées par le picro-carminate, lavées et montées dans l'eau. On fera passer sous la lamelle le liquide suivant dont la formule a été donnée par le professeur Ranvier.

Glycérine	50
Acide formique	1
Solut. saturée d'acide picrique	50

Pour *dissocier les cellules musculaires* de la tunique moyenne on fait macérer un fragment d'aorte dans l'alcool au 1/3 (24 heures) ; puis à l'aide des ciseaux courbes, on retranche un petit fragment de la tunique moyenne que l'on dissocie sur une lame en se servant des aiguil-

(1) Les coupes parallèles à l'axe de l'artère sont de beaucoup les plus instructives.

les. Colorer au picro-carminate ; monter dans ce liquide par le procédé de la demi-dessiccation ; remplacer le picro-carminate par une goutte de glycérine.

Les *lames élastiques seront facilement isolées* si l'on dissocie un lambeau d'aorte qu'on a fait macérer dans une solution d'acide tartrique à 1 p. 100 d'eau.

Rien de plus facile que de mettre en évidence l'*endothélium* de la tunique interne : on enlève un fragment de la portion thoracique de l'aorte sur un rat que l'on vient de sacrifier, on la fend et on la porte dans une soucoupe pleine de la solution de nitrate d'argent à 1 p. 300, et exposée à la lumière directe du soleil. Il est indispensable d'agiter le tissu tout le temps que dure l'exposition. On lave dans l'eau distillée et on monte dans la résine la face interne de l'artère étant tournée en haut.

Les artérioles seront facilement étudiées dans une membrane transparente. Fixer le mésentère ou l'épiploon par le bichromate à 2 p. 100, laver; étendre la membrane sur une lame, colorer à l'hématoxyline de Ranvier, conserver dans la résine dammar. La membrane élastique interne des artérioles sera visible sur les coupes d'un grand nombre d'organes, quand les vaisseaux auront été sectionnés perpendiculairement à leur axe. Il n'est donc pas besoin de faire une préparation spéciale.

§ 3. — VEINES

En raison des différences de structure des veines, il est indispensable de faire un grand nombre de préparations portant sur des veines différentes. On emploiera les mêmes procédés que pour les artères.

§ 4. — CAPILLAIRES

La structure et la disposition des réseaux capillaires ne saurait être convenablement étudiée que par la méthode des injections. Nous étudierons successivement les *instruments employés pour faire une injection*, les *masses* d'injection ; la *pratique des injec-*

tions ; enfin nous terminerons en indiquant la manière d'examiner la *circulation* dans les capillaires.

Instruments. — Une bonne seringue constitue l'instrument le plus simple et le plus commode pour faire une injection. Parmi les nombreux modèles qui se trouvent dans le commerce on choisira un

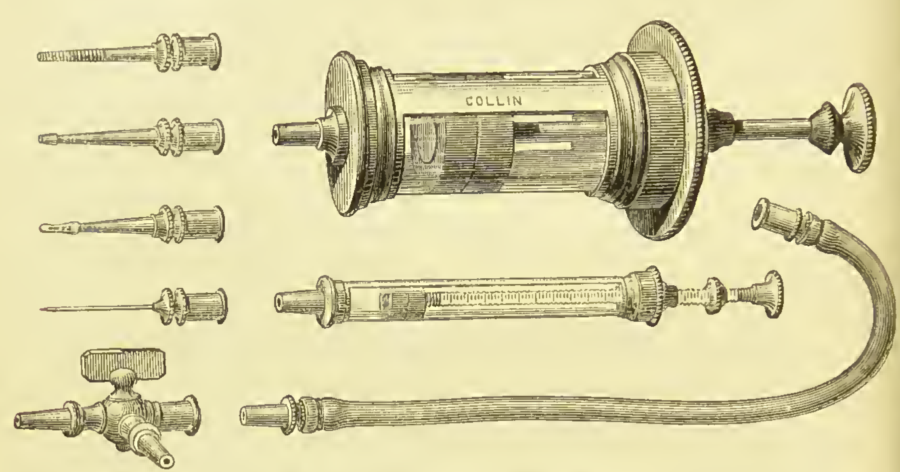


FIG. 20. — Seringue de M. le professeur RANVIER.

instrument de la contenance de 250 grammes environ. Les canules devront s'adapter à la seringue par *frottement*, celles qui se vissent au corps de l'instrument sont détestables. Il est bon d'avoir à sa disposition un jeu de canules *cylindriques* présentant, à leur extrémité libre, une *gorge* ou un arrêt pour fixer la ligature.

La seringue est un instrument peu encombrant, mais coûteux, aussi nous décrirons un appareil à *pression continue* que tout travailleur peut construire lui-même à peu de frais. Du reste il fournira, entre les mains des commençants, de meilleurs résultats que la seringue. On prend un flacon à trois tubulures de la contenance de trois cents centcubes environ. On adapte à l'une des tubulures, une poire en caoutchouc semblable à celle que l'on emploie dans le pulvérisateur de Richardson. L'autre tubulure portera un tube courbé en U qui servira de manomètre à air libre. La troisième tubulure portera un tube de verre plongeant jusqu'à la partie inférieure du flacon. C'est à ce tube que l'on adaptera un tube de caoutchouc destiué à porter les canules. Celles-ci pourront être des canules métalliques ordinaires, mais il est

préférable de fabriquer soi-même des canules en verre. On étire à la lampe un tube de verre comme si l'on voulait faire une pipette en ayant soin toutefois de laisser, dans la portion étirée du tube, une petite ampoule. On casse le tube au niveau de l'ampoule et on passe l'extrémité libre de celle-ci sur la meule ou sur la pierre à aiguiser de façon à former un biseau. On se trouve ainsi en possession d'une canule dont la pointe est *renflée* et *taillée en biseau*, circonstances qui favorisent considérablement l'introduction et le maintien de la canule dans le vaisseau. Si la pointe de la canule a été rendue rugueuse par le frottement de la pierre on la passera dans la flamme d'une lampe à alcool de façon à fondre légèrement ses lèvres.

Deux *grands cristallisoirs*, deux ou trois *pinces à forcipressure*, une *aiguille courbe de Dechamps;* un écheveau de fil de lin, compléteront le matériel indispensable pour faire une injection.

Masse. — Il existe un nombre considérable de masses à injection, nous ne pensons pas qu'il soit nécessaire de les décrire toutes ici (1). Nous choisirons les deux masses le plus souvent employées; la masse de gélatine au *bleu de Prusse* et la masse *au carmin ;* et même nous conseillerons aux débutants de n'employer que la première.

Masse au bleu de Prusse soluble. — On trouve chez les marchands d'articles de microscopie du bleu de Prusse soluble convenablement préparé. Si l'on désire le préparer soi-même on emploiera le procédé de Ranvier.

Faire les deux solutions suivantes.

1.	Eau distillée..............	1000 gr.
	Sulfate de fer.............	50 gr.
2.	Eau distillée..............	1000 gr.
	Ferro-cyanure de potassium.	100 gr.

Mélanger les solutions (1) et (2). Il se forme un précipité de bleu de Prusse insoluble. Jeter le tout sur un filtre et laver le précipité jusqu'à ce que le liquide coule bleu au-dessous du filtre. Dessécher le filtre, gratter le précipité avec une spatule et conserver pour l'usage.

Quand on veut faire une injection on fait dissoudre du bleu dans l'eau distillée jusqu'à saturation. Il est nécessaire d'observer certaines règles si l'on veut obtenir une bonne masse ce qui est indispensable pour la réussite de l'injection. On prend 10 grammes de gélatine que l'on met à ramollir, pendant 20 minutes, dans de l'eau distillée, on la

retire de l'eau et on la fait fondre au bain-marie. D'autre part, on chauffe 200 grammes de la solution de bleu dans le même bain-marie et quand la température des deux solutions (bleu et gélatine) est devenue sensiblement égale on verse le bleu dans la gélatine en remuant constamment avec un agitateur de verre. Il se forme un précipité qui se dissout quand on continue à chauffer. La solution est parfaite quand la baguette de verre retirée du liquide ne présente pas de granulations bleues à sa surface. Filtrer sur une flanelle et maintenir l'injection au bain-marie à la température de 40° jusqu'au moment d'en faire usage. S'il reste de la masse, une fois l'injection faite, il faut ajouter un peu de thymol sans quoi la gélatine se liquéfierait au bout de peu de jours et la masse serait perdue.

Masse au carmin. — La masse au carmin fournit des injections très belles, mais la difficulté que l'on éprouve pour la *neutraliser* exactement sans *précipiter* le carmin, fait qu'on lui préfère la masse au bleu de Prusse dans les travaux courants. Voici deux méthodes qui permettent d'obtenir une masse suffisament neutre.

Prendre 250 gr. de gélatine photographique qu'on laisse ramollir pendant une demi-heure dans l'eau. On la retire de l'eau et on la fait fondre au bain-marie en ajoutant peu à peu 250 gr. de la solution suivante :

Ammoniaque	1
Eau distillée	4
Carmin q. s. pour que la solution soit saturée.	

Filtrer pour séparer le carmin en excès.

Neutraliser en ajoutant de l'acide acétique. Il n'est pas nécessaire de pousser la neutralisation à l'excès car on risquerait de précipiter le carmin, ce qu'il faut éviter avant tout. On laisse la masse se solidifier puis on la coupe en morceaux et on la place dans un morceau de gaze ou de tulle dont on fait un nouet qu'on brasse dans de l'eau contenant 1 gr. d'acide acétique par litre. Par suite de la compression la masse sort à travers les mailles de la gaze sous forme de vermicelles. On lave, pendant plusieurs heures, ces vermicelles placés sur un tamis puis on les fait fondre et on étale la masse fondue sur des plaques de verre ou de parchemin imbibé de paraffine que l'on met à sécher dans un endroit sec. Quand la masse est sèche on la détache du papier et on la conserve dans des flacons. Il suffit de ramollir pendant

quelques minutes cette gélatine dans l'eau puis de la fondre au bain-marie pour obtenir une masse convenable (1).

Le procédé suivant fournit très rapidement une masse au carmin qui ne diffuse pas ou qui diffuse fort peu (2).

1° Ramollir 300 gr. de gélatine dans l'eau pendant 1/2 heure. Égoutter et faire fondre au bain-marie.

2° Peser 10 gr. de carmin n° 40 que l'on triture dans un mortier avec deux ou trois c. c. d'ammoniaque de façon à obtenir une pâte fluide.

3° Ajouter peu à peu cette pâte à la masse de gélatine maintenue au bain-marie. Filtrer sur de la flanelle. Ajouter du thymol si l'on ne veut pas employer immédiatement la masse.

Masses liquides. — Dans certaines circonstances il est avantageux d'employer une masse liquide à froid. La solution *saturée de bleu de Prusse* convient pour les injections colorées ; la solution de *nitrate d'argent* à 1 p. 300 servira de masse quand on voudra imprégner l'endothélium des vaisseaux. Nous reviendrons plus loin sur ce dernier procédé.

§ 5. — PRATIQUE DES INJECTIONS

Nous conseillons de commencer par l'injection de la grenouille.

Injection d'une grenouille à la gélatine bleue. — Une grosse grenouille ayant été immobilisée par la piqûre du bulbe, on sectionne le sternum au niveau de l'appendice xiphoïde en ayant soin de faire l'incision sur la ligne médiane et dans la direction du grand axe du corps. On ouvre le péricarde, on tire le cœur hors de la cavité thoracique et on coupe sa pointe avec des ciseaux. On place la grenouille dans un bain d'eau tiède (40° C.) et on attend que le sang se soit entièrement écoulé. On remplit la seringue, que l'on a échauffée en la plaçant dans l'eau du bain-marie, avec la masse à injection, on place une petite canule et on chasse l'air en poussant le piston tandis que

(1) C'est la formule de Fol, telle que la donne Bolles Lee et Henneguy. On trouvera dans le Traité des méthodes techniques de ces auteurs un grand nombre de formules que nous ne pouvons indiquer ici.

(2) Leçons professées au Collège de France par le professeur Ranvier. In Journal de micrographie, du Dr Pelletan.

la seringue est dirigée verticalement en haut. La grenouille étant à peu près exsangue, introduire la canule par la pointe du cœur jusque dans le bulbe aortique, placer une ligature autour de celui-ci pour le maintenir fixé à la canule. Pousser très lentement l'injection. Quand le système vasculaire est rempli (ce que l'on reconnaît à la difficulté que l'on éprouve à pousser le piston), on place une ligature au-dessous de la canule et on enlève cette dernière. La grenouille est ensuite placée dans un grand cristallisoir rempli de bichromate d'ammoniaque à 2 p. 100. Au bout de quelques heures, la gélatine étant coagulée, on ouvre l'abdomen pour permettre au liquide fixateur de pénétrer plus rapidement. On fera des coupes sur les organes de cette grenouille après durcissement par la gomme et l'alcool. Les préparations *doivent être montées dans la résine dammar.*

Injection d'une grenouille avec la solution de nitrate d'argent. — Préparer une grenouille comme il a été dit plus haut avec cette différence qu'on ne la mettra point dans un bain d'eau chaude. Remplir presque entièrement le flacon de l'appareil à pression continue avec une solution de nitrate d'argent à 1 p. 500. Faire marcher la poire de façon à remplir la canule que l'on introduit et que l'on fixe dans le bulbe aortique en suivant le procédé indiqué plus haut. La pression ne doit pas dépasser 4 centim. de mercure et il est nécessaire de la maintenir pendant 15 ou 20 minutes. Le liquide balaye ainsi le système vasculaire et ressort par l'espace situé entre la canule et les parois du ventricule.

On ouvre ensuite la grenouille dans une cuvette pleine d'eau distillée et exposée à la lumière directe du soleil. Nous conseillons d'examiner, le mésentère, le poumon et la vessie.

Le *mésentère* sera étalé sur une lame par le procédé de la demi-dessiccation et monté dans la résine; le *poumon* et la *vessie* seront fendus dans l'eau distillée, brossés au pinceau pour enlever l'épithélium, et montés à plat dans la résine, la face interne étant dirigée en haut.

Injection d'un mammifère avec la gélatine bleue. — On pourra faire l'expérience sur le *lapin* ou sur le *rat*. On injectera un lapin entier par la carotide ou par la crurale : l'animal ayant été fixé sur un appareil à contention (1) et le poil coupé avec des ciseaux, on

(1) Il est préférable de tuer le lapin par la section du bulbe.

saisit la peau entre le pouce et les autres doigts, au niveau de l'extrémité supérieure de la trachée. Le pli horizontal ainsi formé est incisé verticalement. On soulève avec une pince l'aponévrose qui s'étend entre la ligne médiane et le bord antérieur du sterno-cléido-mastoïdien et on la fend avec des ciseaux. La fente étant élargie avec une sonde cannelée, on écarte en dehors le sterno-cléido-mastoïdien de façon à laisser voir la carotide, la veine et les trois nerfs qui l'accompagnent (n. de cyon; pneumogastrique; grand sympathique), on ouvre la gaine avec un crochet mousse et on isole la carotide. Il est aussi facile de préparer l'artère crurale du lapin. Dans ce but la peau est divisée suivant une ligne droite s'étendant du milieu du ligament de Poupart à la face interne du genou. On sent alors avec le doigt les pulsations de l'artère, on met à nu la gaine des vaisseaux et on aperçoit l'artère placée un peu en arrière entre la veine et le nerf; on dilacère le tissu cellulaire avec une sonde cannelée de façon à isoler l'artère sur une certaine étendue.

On procède ensuite d'une façon identique pour introduire la canule dans l'artère, qu'il s'agisse de la carotide ou de la crurale. A l'aide de ciseaux à pointes bien tranchantes, on fait une incision en V qu'on agrandit s'il est besoin dans le sens du vaisseau (1). On introduit la canule dans le bout central et on place une ligature pour fixer l'artère sur la gorge que porte l'extrémité libre de la canule. Pousser l'injection comme il a été dit plus haut; placer le lapin dans l'eau froide et quand la masse est coagulée (cinq ou six heures après), enlever les organes pour les mettre dans le bichromate.

Chez le *rat* il n'est pas impossible, mais il est difficile d'introduire une canule dans la carotide ou dans la fémorale. On tournera la difficulté en employant le procédé suivant indiqué par le professeur Ranvier (leçons publiées dans le Journal de Micrographie). A l'aide de fort ciseaux on divise complètement un rat en faisant porter l'incision par le milieu de la cage thoracique perpendiculairement à l'axe du corps. Quand le sang s'est écoulé on place la moitié inférieure de l'animal dans un bassin plein d'eau chaude et on introduit la canule dans l'aorte de telle sorte que la pointe de la canule pénètre jusque

(1) Si le lapin est vivant, ce qui est préférable, on laisse le système vasculaire se vider avant d'introduire la canule. Si le lapin est mort et si on a laissé sa température s'abaisser dans les opérations préparatoires, il faut le placer pendant 20 minutes dans un bassin rempli d'eau à 40° C.

dans la portion *sous-diaphragmatique* de l'aorte. On fixe la canule à l'aide d'une ligature et on pousse l'injection. Quand la masse revient par la veine cave inférieure, on place une pince à forcipressure sur cette dernière et on continue à pousser l'injection jusqu'à ce qu'on éprouve de la résistance. Cette méthode fournit rapidement une injection fort belle de toute la partie sous-diaphragmatique du corps.

Injection d'un doigt de l'homme. — Nous achèverons l'étude des injections en indiquant la technique de l'injection d'un doigt de l'homme. Il faut choisir un doigt aussi frais que possible ; en hiver un doigt enlevé 24 heures après la mort fournit des préparations convenables ; en été, il est indispensable de prendre un doigt provenant d'une amputation. Chercher une collatérale que l'on isole sur une étendue de 1 cent. Placer le doigt pendant 25 minutes dans un bain d'eau chaude. On introduit la canule que l'on fixe, et on pousse l'injection. Quand le liquide bleu revient au niveau de l'incision on pose à la base du doigt une forte ligature (1) de façon à enserrer tous les tissus, puis on continue à presser sur le piston jusqu'à ce que l'on sente de la résistance. Il faut 2 ou 3 cent. c. de masse pour faire cette injection ; dès que la masse est coagulée, on place le doigt dans le bichromate après avoir fendu les tissus.

Circulation dans les capillaires. — Pour étudier la circulation capillaire, on emploie une membrane transparente, telle que la langue, la membrane interdigitale, le poumon et le mésentère de la grenouille, la queue du têtard, etc.... Nous indiquerons seulement les procédés employés pour l'examen du *mésentère* et du *poumon* de la grenouille. En les modifiant légèrement le débutant arrivera sans peine à les appliquer aux autres organes.

Avant de faire cette observation, il est nécessaire de *curariser* l'animal. La quantité de curare qu'il faut employer est extrêmement variable ; cela dépend de la pureté du produit et du volume de l'animal. Il est donc indispensable d'expérimenter préalablement la force de son curare. On pourra essayer d'injecter :

Eau..................................	9 gouttes.
Solution de curare à 1 pour 0/0..........	1 goutte.

On introduira ce liquide sous la peau du dos avec une seringue à

(1) Cette ligature sera faite soit au moyen d'une grosse ficelle, soit avec un fil de laiton serré avec le serre-nœud.

injections hypodermiques ordinaire. Il est bon que l'action ne se produise qu'une heure ou deux après l'injection. Si elle était immédiate, on diminuerait la dose de curare. En prenant cette précaution, on peut conserver complètement immobile, pendant plusieurs jours, une grenouille de forte taille. En outre, il faut avoir soin de tenir la peau de l'animal constamment humide. On peut encore immobiliser la grenouille par une injection d'eau chloroformée ; c'est même le procédé employé par Conheim dans son étude sur la diapédèse.

On prépare le *mésentère* de la manière suivante : Après avoir curarisé une grenouille *mâle*, on incise longitudinalement la peau sur un des côtés de l'abdomen, puis on la soulève, pour s'assurer de la position exacte des vaisseaux cutanés. On essuie toutes traces de sang, et on coupe les muscles au point de l'incision cutanée. Il faut éviter, avec soin, toute hémorrhagie, quelque minime qu'elle soit ; aussi, on se trouvera bien d'employer le thermocautère, ou une tige de fer chauffée au rouge sombre. L'opération sera plus longue, mais le résultat sera infiniment meilleur. Cela fait, on renverse la grenouille sur le dos, et on la place sur un porte-objet construit spécialement pour cette observation. On prend une plaque de liège, de 10 ou 12 centim. de côté, sur laquelle on perce une fenêtre large de 1 cent. environ. D'un côté de cette ouverture, on pose la grenouille ; de l'autre, on place un petit rectangle de liège ayant une épaisseur telle que sa face supérieure se trouve au niveau de l'ouverture latérale de l'abdomen. On attire une anse intestinale avec le mésentère qui la soustend, et on la fixe avec des épingles sur le petit rectangle de liège. Le mésentère se trouve ainsi tendu au-dessus de la fenêtre de la lame de liège qu'on fait coïncider avec le trou de la platine du microscope. Examiner avec un grossissement moyen ; si l'on fait usage d'un objectif puissant, il est bon de couvrir la membrane avec une lamelle.

On étudie la circulation dans le *poumon* à l'aide de l'appareil de Holmgren. Cet instrument est formé d'une canule spéciale et d'un porte-objet métallique.

La *canule* présente, près de son extrémité, un orifice au-dessus et au-dessous duquel se trouvent deux rainures circulaires. Elle sert à maintenir le poumon distendu tout le temps que dure l'observation.

Le *porte-objet* est formé d'une lame percée d'un orifice circulaire que ferme une lame de verre. Au-dessus de cet orifice se trouve un anneau métallique dans lequel est serti un disque également en

verre. Cet anneau, commandé par une crémaillère, peut descendre ou monter au-dessus du porte-objet de façon à diminuer ou à augmenter l'espace qui sépare les deux lames de verre.

Pour faire l'observation on procédera de la manière suivante :

1° Curariser une grenouille.

2° Tuer une seconde grenouille par la section du bulbe ouvrir sa cavité abdominale et réséquer une partie du gros intestin.

3° Enfiler ce gros intestin bien lavé dans la canule de Holmgren et le fixer par deux ligatures au niveau des gorges dont nous avons parlé. Retrancher les portions de l'intestin qui dépassent.

4° Pratiquer, au niveau de l'aisselle de la grenouille curarisée, une incision pénétrant jusque dans la cavité viscérale.

5° Introduire la canule dans la glotte de la grenouille, souffler dans la canule et fermer le robinet. L'air remplit le poumon qui fait saillie au dehors et distend le manchon qui fixe la canule.

6° Cela fait, placer la grenouille sur une lame de liège sur laquelle on a disposé l'appareil de Holmgren. Introduire le poumon entre les deux lames de verre que l'on rapproche de façon à le comprimer légèrement. Examiner avec un grossissement moyen.

§ 6. — GANGLIONS LYMPHATIQUES

Il est indispensable d'exécuter un certain nombre de préparations pour démontrer la structure des ganglions lymphatiques.

1. — On fend un ganglion lymphatique de l'homme ou du chien qu'on met à macérer dans l'alcool au tiers. Il est bon de choisir un ganglion de petit volume ou de le diviser en plusieurs morceaux si l'on n'avait à sa disposition qu'un ganglion volumineux. Après 24 heures de séjour dans le liquide dissociateur on le fait dégorger dans l'eau (20 minutes) et on le durcit par l'action successive de la gomme et de l'alcool. Couper au microtome de Malassez ou au microtome Ranvier. Les sections seront placées dans l'eau, où on les laissera une demi-heure pour enlever la gomme. On choisit une coupe, pas trop mince, que l'on porte dans un cristallisoir rempli d'eau filtrée au fond duquel on la laisse s'étaler. On prend ensuite un pinceau de martre à pointe bien régulière et on donne, sur toute la surface de la section, de petits coups, sans frotter, de façon à la laisser appliquée et pour ainsi dire

collée au fond du cristallisoir. Puis on la retourne et on fait la même opération sur l'autre face. Cette manœuvre a pour but de *chasser* les cellules lymphatiques qui infiltrent les ganglions ainsi que les cellules endothéliales des travées du tissu réticulé. Placer la coupe sur une lame, colorer au picro-carminate et monter dans la glycérine (1).

2. — La préparation précédente permettra d'observer le tissu réticulé entièrement débarrassé des cellules plates qui le tapissent. Celle que nous allons décrire montrera ce même tissu avec les cellules endothéliales. Piquer un ganglion lymphatique du chien avec la canule d'une seringue de Pravaz remplie d'une solution d'acide osmique à 1 pour 100 et pousser doucement l'injection. Placer le ganglion dans l'eau (une heure), durcir par l'action successive de la gomme et de l'alcool. Faire des coupes très minces que l'on agite quelque temps dans l'eau en employant le procédé du flacon.

3. — On pratiquera ensuite des coupes parallèles au grand axe d'un ganglion en faisant passer la section par le hile. (*Durcissement par la gomme et l'alcool*) et on les examinera dans la *glycérine*, après coloration par le *picro-carmin*. Si l'on veut établir la différence des *sinus* et des *follicules*, il est nécessaire d'injecter, dans un ganglion, du bleu de Prusse en solution dans l'eau. Fixer par le bichromate d'ammoniaque et durcir par la gomme et l'alcool. Monter les coupes, colorées par l'hématoxyline, dans la résine dammar.

4. — Les vaisseaux sanguins seront étudiés sur les ganglions du lapin ou du rat dont on aura injecté le système vasculaire avec de la gélatine bleue.

§ 7. — VAISSEAUX LYMPHATIQUES

Les gros vaisseaux lymphatiques seront étudiés sur des coupes pratiquées en suivant la méthode indiquée pour les artères. Ceux qui mesurent un petit diamètre peuvent être observés avec tous leurs

(1) Voici un procédé qui donne des résultats plus rapides et plus avantageux que le pinceau. On met la coupe dans un flacon que l'on a rempli à moitié d'eau, on bouche et on agite vivement. Les cellules lymphatiques se dégagent du réticulum sans qu'il soit besoin d'avoir recours au pinceau.

détails (valvules, fibres musculaires, etc...) sur le mésentère d'un animal peu chargé de graisse. On tend sur une lame de verre un lambeau de mésentère sur lequel on fait agir une solution d'*acide osmique* à 1 p. 100 (1/2 heure). *Laver, colorer par le picro-carminate* (3 ou 4 heures), *laver de nouveau*. Examiner dans la *résine dammar*.

CHAPITRE HUITIÈME

SYSTÈME NERVEUX

§ 1. — NERFS PÉRIPHÉRIQUES

Dissociation. — C'est par la dissociation que l'on doit commencer l'étude des éléments qui entrent dans la composition des nerfs. On choisira deux nerfs, formés : l'un, de fibres nerveuses à myéline, l'autre, de fibres sans myéline ou de Remack.

Le sciatique de la grenouille est constitué par un seul faisceau nerveux qui se bifurque à l'extrémité inférieure du nerf. Cette disposition rend la dissociation particulièrement facile, aussi c'est lui que l'on prendra pour étudier les tubes nerveux isolés. Après avoir détruit la moelle d'une grenouille à l'aide d'une aiguille glissée dans le canal rachidien, on écorche l'animal et on le couche sur le ventre. Le triceps fémoral, en dehors, et le demi membraneux, en dedans, limitent un espace qui indique la situation du nerf sciatique. On écarte avec précaution les deux muscles, et on découvre, entre eux, le nerf que l'on isole jusqu'au-dessous de l'articulation du genou, au niveau de laquelle il se bifurque. Il faut bien prendre garde de ne toucher le nerf que le moins possible, et surtout il faut éviter soigneusement de le saisir avec une pince. Un stylet à pointe mousse servira pour soulever le sciatique. Il faut ensuite fixer le nerf dans l'état d'extension physiologique. Le procédé, indiqué par le professeur Ranvier, est devenu classique, aussi il faut répéter, point par point, l'expérience de ce savant histologiste. On prend une petite tige de bois (une allumette par exemple) dans laquelle on pratique un évidement ; on la glisse sous le nerf et on fixe ce dernier à l'aide de deux ligatures, en ayant soin de placer l'inférieure au-dessous de la bifurcation. On coupe le nerf au delà de ces

ligatures et on porte le tout dans l'acide osmique à 1 p. 100. Cette méthode donne des préparations admirables, mais il arrive que les débutants tendent trop le nerf, aussi ils pourront modifier le procédé comme nous allons l'indiquer. Le nerf étant bien isolé, on prend une pipette remplie d'acide osmique à 1 p. 100, et on l'arrose tandis qu'il est encore en place, avec ce liquide fixateur. Quelques gouttes suffisent, si on a soin de promener la pipette sur toute la longueur du nerf. Au bout de 3 ou 4 minutes on peut couper le nerf sans qu'il revienne sur lui-même, et le placer directement dans la solution d'osmium. On l'y abandonne pendant une demi-heure à 1 heure, puis on le porte dans un grand cristallisoir plein d'eau. C'est dans ce bain que l'on procédera à la dissociation. On saisit chacun des faisceaux de bifurcation avec des pinces fines et on les écarte doucement. Le nerf étant divisé en deux faisceaux, on répète cette opération sur chacun d'eux, jusqu'à ce qu'on obtienne un faisceau renfermant un très petit nombre de tubes nerveux. Monter sur une lame, examiner à un faible grossissement, et si la dissociation est suffisante, ajouter une goutte de carmin aluné, que l'on remplacera par de la glycérine quand la coloration des noyaux sera produite.

Les fibres *sans myéline* ou de Remack existent en nombre considérable dans le nerf pneumogastrique. On peut donc prendre ce nerf chez le chien, chez le lapin, chez l'homme, etc., mais comme il est assez facile de le découvrir chez la grenouille, nous choisirons cet animal que l'on peut se procurer en tout temps. « On couche, sur le dos, une grenouille immobilisée par la section de la moelle. Le sternum est divisé sur la ligne médiane et les deux moitiés de la paroi thoracique sont écartées de manière à laisser voir le péricarde et les poumons, puis on introduit une forte baguette de verre dans l'œsophage. On voit alors que :

1° Les deux aortes s'écartent l'une de l'autre et remontent, en haut et en dehors, contre l'extrémité cartilagineuse des cornes postérieures de l'os hyoïde.

2° Des fibres musculaires, issues de chacune de ces cornes, se portent en arrière et en haut vers la région occipitale : ce sont les muscles pétro-hyoïdiens qui s'insèrent en bas sur ces appendices cartilagineux en haut sur le rocher. Le plus inférieur de ces faisceaux musculaires est le *satellite du pneumogastrique* qui longe son bord inférieur.

3° En arrière ces muscles sont croisés par un cordon nerveux blanc, le nerf *hypoglosse* qui se dirige en haut et en dedans vers les muscles de la langue. Plus près de la ligne médiane, plus profondément, mais suivant la même direction se trouve le nerf *glosso-pharyngien*.

4° Enfin le *nerf laryngé* croise le larynx au-dessus de l'extrémité de la corne inférieure de l'os hyoïde ; c'est le seul nerf que l'on puisse confondre avec le *pneumogastrique* » (1). On laisse tomber une goutte d'acide osmique à 1 p. 100 sur le nerf puis on en résèque un fragment que l'on abandonne pendant 20 minutes dans un c. c. de la solution fixatrice. Laver, dissocier sur une lame avec les aiguilles, colorer au picro-carminate que l'on remplace lentement par de la gly cérine.

Coupes. — Il est indispensable de compléter les renseignements fournis par les dissociations en pratiquant des coupes perpendiculaires à l'axe du nerf.

1° On exécutera une première série de préparations en procédant comme il suit : Un petit nerf de l'homme (nerf collatéral des doigts, ou du lapin (sciatique) bien tendu sur une allumette est placé pendant 24 heures dans l'acide osmique à 1 p. 100. Laver à grande eau (12 h.), durcir par l'action successive de la gomme et de l'alcool. Les coupes exécutées à main libre ou à l'aide du microtome Ranvier seront colo rées par le picro-carminate (12 heures), lavées et montées dans l'eau On remplacera l'eau par de la glycérine.

2° Les coupes de ces mêmes nerfs, pratiquées après l'action successive du *bichromate d'ammoniaque*, de la *gomme* et de *l'alcool*, seront colorées d'une manière différente. Les unes, destinées à montrer les gaines lamelleuses et le tissu conjonctif des nerfs, seront teintes par l'*hématoxyline* et l'*éosine*, et conservées dans la résine dammar après déshydratation et éclaircissement par l'essence de bergamote. Les autres seront colorées en employant la méthode de Weigert qui donne à la myéline une coloration tout à fait spécifique. On aura soin de suivre minutieusement la marche suivante : Les coupes seront faites sur un nerf fixé et durci par le bichromate d'ammoniaque jusqu'à ce qu'il présente une teinte brune et non verte, et conservé pendant quelque temps dans l'alcool. On les abandonne pendant

(1) BURDON SANDERSON. Manuel du laboratoire de physiologie.

24 heures dans une certaine quantité de la solution suivante placée dans un endroit chaud.

Solution saturée d'acétate de cuivre.........	20
Eau filtrée..............................	20

On les porte ensuite dans l'hématoxyline de Weigert dont on élève la température à 35 ou 40°.

Hématoxyline..............................	1 partie.
Alcool..................................	10
Eau....................................	90
Solution saturée de carbonate de lithine.....	1

Quand la coloration est produite, ce qui arrive au bout de quelques heures, on lave les coupes dans l'eau et on les transporte dans la solution décolorante :

Borax...............	2 gr.
Prussiate rouge de potasse.................	2,50
Eau....................................	20 »

Elles doivent y séjourner jusqu'à ce que la différenciation des fibres nerveuses soit complète ce qui se produit, suivant les cas, en une demi-heure ou en une heure. Il est bon de s'assurer du degré de décoloration en examinant les coupes à un faible grossissement. On lave les coupes dans l'eau et on les monte dans la résine dammar suivant la méthode habituelle.

3° Enfin pour étudier les fibres sans myéline on fera des coupes transversales sur le pneumogastrique du lapin ou du chien après fixation par l'acide osmique et durcissement par l'action successive de la gomme et de l'alcool. Colorer par le carmin aluné et conserver dans la glycérine.

§ 2. — MOELLE ÉPINIÈRE

Il n'est pas de préparations plus belles que celles que l'on obtient par la dissociation de la moelle épinière, mais on doit avoir bien soin de choisir un réactif dissociateur approprié à l'étude que l'on veut faire. Ainsi nous indiquerons deux procédés applicables, l'un à l'observation des *cellules nerveuses*, l'autre à l'examen des *fibres centrales*.

Cellules nerveuses. — Une tranche de la moelle du bœuf mesurant un ou deux millimètres d'épaisseur est mise à macérer dans une certaine quantité d'*alcool au tiers*. Après 24 heures de séjour, on enlève à l'aide de la pointe d'un scalpel, un fragment de substance grise que l'on porte dans un *tube à urine* contenant 15 c. c. d'eau distillée. On agite vivement de façon à dissocier les éléments et on ajoute 1 *c. c. de picro-carminate* (1). Quand la coloration est produite, ce qui arrive en général, au bout d'une heure, on ajoute un centimètre cube de la solution d'acide osmique à 1 p. 0/0 (1). On laisse reposer 24 heures et, quand les éléments se sont déposés au fond du tube, on décante le liquide qui surnage et onl e remplace par de l'eau distillée. On renouvelle plusieurs fois ce lavage par décantation et on laisse déposer. Il suffit de puiser avec une pipette une goutte du dépôt et de le porter sur une lame pour obtenir une belle préparation de cellules nerveuses isolées et magnifiquement colorées. Ce procédé permet l'étude extemporanée des éléments cellulaires de la moelle ; il convient maintenant de les monter en préparations persistantes. Quand on a bien lavé les cellules et qu'on a décanté le liquide qui surnage on ajoute 5 c. c. d'eau distillée que l'on a additionnée d'un centimètre de glycérine légèrement colorée par du picro-carminate. On laisse le tube débouché de façon à permettre au liquide de se concentrer par évaporation et le lendemain on puise avec une pipette une goutte du mélange que l'on porte sur une lame. C'est une opération très délicate que de placer la lamelle sans chasser les cellules nerveuses hors du champ de la préparation, aussi on a cherché un moyen de tourner cette difficulté. Au lieu d'ajouter de l'eau glycérinée, on monte une petite quantité du dépôt dans une gelée à la glycérine ce qui empêche le déplacement des éléments. On peut employer indifféremment la plupart des glycérines gélatinées dont on trouvera la formule dans les auteurs. En l'absence de préférences particulières on choisira le mélange de Kaiser.

Eau distillée..............................	1 partie.
Gélatine..................................	7 parties.

Faire dissoudre en chauffant au bain-marie. Ajouter 6 *parties de glycérine puis* 1/2 *p. d'acide phénique. Filtrer sur de la flanelle.*

(1) RANVIER. *Traité technique et comptes rendus de l'Académie des sciences*, 1882.

Pour monter les cellules nerveuses dans ce mélange on chauffe doucement une lame au milieu de laquelle on a déposé un fragment de gélatine glycérinée. Quand celle-ci est bien fondue on ajoute, à l'aide d'une pipette, une petite quantité du dépôt formé par les cellules dissociées, on mélange avec une aiguille et on couvre d'une lamelle. Par le refroidissement la lamelle est suffisamment fixée à la lame, pour qu'on puisse se dispenser de luter il est cependant préférable d'ajouter une bordure de cire ou de Maskenlack.

Fibres nerveuses. — La *dissociation* des fibres nerveuses de la moelle constitue une opération extrêmement délicate qu'il est même impossible d'effectuer si l'on n'emploie pas la *méthode par injection interstitielle* du professeur Ranvier. On pique le faisceau antéro-latéral de la moelle du chien parfaitement fraîche avec l'aiguille d'une seringue de Pravaz chargée d'acide osmique à 1 pour 0/0 et on pousse doucement l'injection. On enlève un petit fragment avec le rasoir et on dissocie dans l'eau sur une lame. Coloration au picro-carminate et conservation dans la glycérine.

Coupes. — Il existe un nombre considérable de procédés pour faire des coupes de la moelle; nous décrirons seulement celles qui nous paraissent devoir rendre des services aux débutants. C'est la moelle de l'homme que nous prendrons pour exemple, mais il est bien entendu que tout ce que nous dirons est exactement applicable à la moelle des autres animaux.

Fixation et durcissement. — On prend trois segments de moelle l'un au niveau de la région cervicale, l'autre au niveau de la région dorsale et le troisième dans la région lombaire. On les coupe de telle sorte que leur surface de section soit bien perpendiculaire à l'axe de la moelle et que leur longueur ne dépasse pas 1 centimètre et on les porte dans un bocal contenant trois ou quatre cents grammes de liquide d'Erlicki dont nous rappelons la formule.

Bichromate de potasse........................	2 gr.
Sulfated e cuivre..............................	0,50
Eau..	100

Si l'on dispose d'une étuve chauffant à 37° environ, ou y place le bocal. Le durcissement s'effectue en quatre ou cinq jours; à la température ordinaire, il faut dix ou douze jours. Il est bon de renouveler le liquide fixateur une ou deux fois pendant la durée de l'opération.

La pièce est ensuite lavée à grande eau (24 heures) puis placée dans l'alcool.

Coloration inclusion. — Ici, pas plus qu'ailleurs, nous ne voulons indiquer tous les procédés; nous conseillons aux débutants de s'en tenir aux deux méthodes suivantes :

1re *méthode.* — Un segment de moelle de 1/2 cent. de longueur est inclus dans la *celluloïdine* en suivant la technique indiquée plus haut. Les coupes, exécutées à l'aide du microtome Thoma ou plus simplement du microtome Ranvier sont reçues dans un bain d'alcool d'où on les tire pour les colorer par la *méthode de Weigert*. Conservation dans la résine dammar.

2e *méthode.* — Un second segment de moelle mesurant 1/2 centimètre de longueur est placé au sortir de l'alcool dans quelques centimètres cubes de *carmin alcoolique au borax.* Cette teinture, due à Grenacher, se prépare de la manière suivante :

Borax	4
Carmin	3
Eau distillée	100

Faire bouillir pour dissoudre le carmin (15 *ou* 20 *minutes*), *filtrer et ajouter un volume égal d'alcool à* 95°.

La pièce devra séjourner dans ce bain 24 à 48 heures, après quoi on la décolorera légèrement dans l'alcool contenant 3 à 4 gouttes d'acide chlorhydrique pour 100. On la porte ensuite dans l'alcool à 95° pur, puis dans l'alcool absolu et on termine par la série des opérations de l'*inclusion dans la paraffine.* Nous devons indiquer un détail qui permet de produire très rapidement la pénétration de la paraffine. Au sortir du bain d'*essence de bois de cèdre* la moelle est placée dans un tube à essai renfermant de la paraffine que l'on tient à l'état de fusion en chauffant au bain-marie. Ce tube est fermé par un bouchon traversé d'un tube de verre qu'on met en communication avec la branche aspiratrice d'une *trompe à eau.* Quand on ouvre le robinet pour produire l'aspiration on voit de petites bulles s'échapper en abondance de la pièce, c'est l'essence de cèdre qui se vaporise. Peu à peu, ces bulles deviennent plus rares et au bout d'une demi-heure, on n'en voit plus aucune, la pénétration est achevée. Il reste à orienter la pièce dans une petite boîte et à verser dessus une certaine quantité de paraffine dont le point de fusion aura

été convenablement choisi pour achever l'opération. Il est bon de prendre de la paraffine fraîche car celle qui a servi à la pénétration de la moelle a acquis, sous l'influence du vide, une dureté excessive. On trouve des *trompes* en verre pour peu d'argent chez les fabricants d'articles de chimie, mais il est absolument indispensable d'avoir de l'eau *sous pression* pour faire fonctionner cet appareil. Francotte a imaginé un dispositif extrêmement simple qui permet de faire une inclusion dans le vide alors même que l'on ne disposerait ni d'une trompe, ni d'un appareil aspirateur quelconque : « Un récipient en fer-blanc, de la capacité d'un demi-litre, est muni de deux tubulures dont l'une porte un tube barométrique et l'autre un tube de verre communiquant avec un flacon où l'on tient en fusion de la paraffine à l'aide d'un bain-marie. Il est utile d'interposer un flacon entre le récipient et le bain de paraffine pour retenir les vapeurs d'eau s'il s'en produisait en trop grande quantité. On remplit le récipient à moitié d'eau et on chauffe avec une lampe à alcool de façon à produire l'ébullition. L'air s'échappe par un tube muni d'une pince. Quand la vapeur s'élance en jet par ce tube on enlève la source de chaleur, on ferme la pince et on refroidit doucement le vase en fer-blanc à l'aide d'une éponge mouillée. La vapeur d'eau redevient liquide et le vide se produit. Après une demi-heure on laissera l'air rentrer doucement dans l'appareil et on achèvera l'inclusion comme il a été dit plus haut » (1).

Les segments de moelle inclus dans la paraffine seront coupés à l'aide du *microtome à bascule* ou du microtome *Thoma*. A la rigueur, si l'on ne disposait pas de ces deux instruments, on pourrait se servir du petit microtome Ranvier, mais les coupes seraient infiniment moins belles. On les étale sur un porte-objet en appuyant légèrement avec un pinceau sec. On *dissout la paraffine* par la benzine, et on monte dans la *résine* dammar.

Bulbe rachidien. Cerveau. Cervelet.

On prendra le bulbe rachidien d'un enfant très jeune, qu'on divisera en segments de 1/2 centimètre, en ayant bien soin de noter leur ordre de succession. Le meilleur moyen, pour ne pas se tromper, est de les suspendre à un fil auquel on fixera un papier portant un numéro. On emploiera les procédés de *fixation*, de *coloration* et d'*inclu-*

sion, en suivant minutieusement la technique que nous avons appliquée à l'étude de la moelle épinière.

Les circonvolutions du cerveau et du cervelet de l'homme fourniront les préparations suivantes :

1° Dissociation des cellules ganglionnaires après macération dans l'alcool au tiers.

2° Coupes après durcissement par le liquide d'Erlicki. Coloration par le *carmin boracique alcoolique*, ou par la *méthode de Weigert*. Inclusion dans la *celluloïdine* ou dans la *paraffine*. Conservation des coupes dans le *dammar*.

CHAPITRE NEUVIÈME

APPAREIL DIGESTIF

§ 1. — MUQUEUSE DE LA BOUCHE ET DES LÈVRES

La muqueuse de la boucbe et des lèvres sera étudiée sur des coupes pratiquées après fixation par l'alcool et durcissement par l'action successive de la gomme et de l'alcool. On laissera les coupes se dégommer dans l'eau (1/2 heure) puis on les montera sur une lame. Colorer avee du piero-carminate, eouvrir d'une lamelle, remplaeer la teinture par de la glycérine.

Les cellules lamellaires, qui forment la eouche la plus superfieielle de l'épithélium buccal, seront facilement isolées par le procédé suivant : on raele, avec l'ongle, la face interne de la joue et l'on délaye le produit du raclage, sur une lame, dans une goutte de sérum iodé fort. Couvrir d'une lamelle et examiner. Si l'on veut faire une préparation persistante, on commence par dissocier le produit du raclage dans une goutte de salive, on expose aux vapeurs d'acide osmique et on colore par le picro-earminate.

§ 2. — MUQUEUSE DE LA LANGUE

On obtiendra de très belles préparations de la muqueuse linguale avec des pièees fixées et durcies par l'alcool et la gomme. Colorer les coupes par le picro-carminate et conserver dans la glycérine neutre ou additionnée de picro-earmin.

L'étude des *bourgeons du goût* réclame une teehnique spéciale : on prend pour objet d'étude, soit l'organe *folié* du lapin, soit une *papille caliciforme*. Les papilles foliées du lapin sont situées à la

partie postérieure des bords latéraux de la langue, où elles apparaissent sous forme d'un disque ovale, rosé à peine saillant (Ranvier). Les papilles caliciformes forment comme on le sait, à la partie postérieure de la langue, une sorte de V ouvert en avant. Quel que soit l'objet que l'on choisisse, il est indispensable de bien le débarrasser des tissus qui l'environnent afin d'avoir une pièce très petite, que l'on place dans l'*acide osmique* à 1 p. 100. Après 12 heures de séjour dans cette solution on lave à grande eau (24 heures) et on durcit par la gomme et l'alcool. Les coupes seront colorées par le carmin aluné et conservées dans la glycérine.

La méthode de l'*imprégnation par l'or* fournit de fort belles préparations. Voici, d'après le professeur Ranvier, la technique qu'il faut employer. *Jus de citron* (10 minutes), *chlorure d'or* à 1 p. 100 (40 minutes). Réduire dans l'*eau acétifiée* en suivant la marche indiquée pour la préparation des terminaisons nerveuses des muscles (1).

§ 3. — MUQUEUSE DU PHARYNX

On résèque deux lambeaux de muqueuse, l'un à la partie supérieure, l'autre à la partie inférieure du pharynx. On les étale au fond d'une soucoupe dans laquelle on verse de l'alcool à 95°, puis on durcit par la gomme et l'alcool. Les coupes, colorées par le picrocarminate, seront conservées dans la glycérine.

Il n'y a pas d'objet plus commode que la grenouille pour faire l'étude de l'épithélium de la portion vibratile du pharynx. On l'observe facilement en raclant la paroi pharyngienne de cet animal avec un scapel et en plaçant le produit du raclage dans une goutte d'humeur aqueuse obtenue par le procédé que nous avons indiqué dans le chapitre traitant de l'examen des objets vivants. Couvrir d'une lamelle et examiner à l'aide d'un fort grossissement.

Si l'on veut faire une préparation persistante des cellules vibratiles on emploie la méthode indiquée par le professeur Ranvier. On fait macérer un fragmant du pharynx ou de l'œsophage de la grenouille dans quelques c. c. de sérum iodé faible. Après 24 heures de séjour dans ce liquide on racle la face interne à l'aide d'un scalpel et

(1) Voyez page 87.

on délaye le produit du raclage dans une goutte de picro-carminate. Couvrir d'une lamelle et faire passer *très lentement* la glycérine en gardant la préparation dans une chambre humide.

On pourrait encore dissocier rapidement le produit du raclage sur une lame, exposer aux vapeurs d'acide osmique (10 minutes) et colorer par le picro-carminate.

Les *amygdales* seront étudiées en suivant les méthodes employées pour l'étude des ganglions lymphatiques.

§ 4. — ŒSOPHAGE

Il est extrêmement difficile de se procurer des portions du tube digestif de l'homme suffisamment fraîches pour faire de bonnes préparations histologiques. Cela est d'autant plus regrettable que la structure des différentes portions du tube digestif présente des variations considérables suivant les espèces animales que l'on observe.

Nous conseillons à défaut de pièces enlevées à l'homme très peu d'heures après la mort, de choisir comme objet d'étude, le lapin, le chien et le rat.

Fendez l'œsophage de l'un de ces animaux, réséquez-en une portion que vous étalerez sur une plaque de liège ou au fond d'une soucoupe. Versez dessus de l'alcool fort et laissez agir pendant 24 heures. Après quoi durcissez par l'action successive de la gomme et de l'alcool. Faites des coupes transversales et longitudinales. Coloration au picro-carminate et conservation dans la glycérine rouge.

Une autre portion sera fixée par la solution de *bichromate d'ammoniaque* à 2 p. 100 (8 jours); après les *lavages habituels* durcir par l'action successive de la *gomme* et de l'*alcool*. Colorer les coupes par l'*hématoxyline* et l'*éosine* et monter dans la *résine dammar*.

L'œsophage du lapin fournit un excellent matériel pour observer les *terminaisons des nerfs dans les muscles*. Placez une ligature vers la partie inférieure de l'œsophage, et injectez par la partie supérieure du *jus de citron*, fraîchement exprimé et filtré. Au bout de quelques minutes, lavez légèrement, et remplacez le jus de citron par du *chlorure d'or* à 1 p. 100; liez, afin de maintenir l'œsophage légèrement distendu; réséquez la portion comprise entre les deux ligatures, et placez-la pendant 20 minutes dans un bain de chlorure d'or. Après

quoi, fendez le segment d'œsophage, et mettez-le pendant 24 heures dans l'acide au 1/4. Il est extrêmement facile d'enlever un lambeau de tunique musculeuse et de le monter à plat dans de la glycérine.

§ 5. — ESTOMAC

La muqueuse de l'estomac s'altère avec une telle facilité que dans les autopsies pratiquées 24 heures après la mort, elle est presque entièrement digérée. C'est donc, avec l'estomac d'un animal récemment sacrifié, qu'on fera les préparations destinées à l'observation microscopique.

1. **Estomac de la grenouille.** — C'est sur l'estomac de la grenouille que l'on étudiera l'*épithélium* qui tapisse la muqueuse gastrique. Faites macérer un estomac de grenouille, que vous aurez préalablement fendu, dans quelques centimètres d'*alcool au* 1/3. Après 24 heures de séjour dans le dissociateur, raclez la face interne de l'organe avec un scalpel, et délayez le produit du raclage sur une lame, dans une goutte d'alcool au 1/3. Ajoutez du *picro-carminate* et montez dans la *glycérine* par le procédé de la demi-dessiccation.

On complètera les renseignements, fournis par la préparation précédente, en pratiquant des coupes sur l'estomac, fixé à l'état d'extension. Enlevez l'estomac d'une grenouille avec un bout d'œsophage et deux ou trois centimètres d'intestin grêle. Introduisez, par l'œsophage, la canule d'une seringue remplie d'un liquide fixateur et poussez doucement l'injection. Quand la cavité de l'organe aura été balayée par le liquide, placez une ligature sur l'intestin grêle, et continuez à pousser le piston de façon à distendre l'organe. Cela fait, liez l'œsophage au-dessous de la canule et placez le tout dans un flacon renfermant une certaine quantité du liquide fixateur. Il est bon de faire cette expérience avec de l'*alcool absolu* et avec de l'*acide osmique*. Un estomac de grenouille peut être coupé après avoir séjourné une heure dans l'alcool absolu. Si l'on fait usage de l'acide osmique, il est bon, après avoir fait agir ce réactif pendant une demi-heure, de laver (une ou deux heures) et de durcir par l'action successive de la gomme et de l'alcool. Coloration des coupes par le carmin aluné et conservation dans la glycérine.

2. **Estomac des mammifères.**— Prenez pour objet d'étude l'esto-

mac du *chien*, du *chat* ou du *lapin*. Réséquez un fragment de cet organe au niveau de ses trois régions anatomiques : au *cardia*, près de l'extrémité inférieure de l'œsophage ; dans la région du *grand cul-de-sac*, et au niveau du *pylore*. Étalez minutieusement les fragments de l'organe, qui ne doivent pas mesurer plus de 1 centim. de diamètre, sur le fond d'une soucoupe ou sur une plaque de liège, et immergez-les dans le liquide fixateur. Vous emploierez l'*alcool fort*, l'*acide osmique*, le *bichromate d'ammoniaque* que vous ferez agir sur des morceaux différents que vous utiliserez en suivant la technique spéciale à chacun de ces réactifs. Complétez, s'il y a lieu, le dureissement par l'action suceessive de la gomme et de l'aleool. Colorez vos coupes avec le *picro-carmin*, avec le *bleu de quinoléine* (après l'alcool), avec l'*hématoxyline de Bœhmer* (après le biehromate), et avec le *carmin aluné* (après l'acide osmique).

§ 6. — INTESTIN GRÊLE

L'intestin grêle présente à étudier : un *épithélium* de revêtement ; un épithélium *glandulaire* ; un *ensemble de tuniques* ; des *vaisseaux* et des *nerfs*.

Épithélium de revêtement. — Prenez, pour votre observation, une anse de l'intestin grêle de la grenouille ou du lapin. Fendez-la dans toute sa longueur et faites-la macérer pendant 24 heures dans le *sérum iodé faible* ou dans l'*alcool au* 1/3. A l'aide d'un scalpel grattez la faee interne de l'organe et délayez le produit du raclage, sur une lame, dans une goutte du dissociateur employé. Colorez par le picro-earminate et eonservez dans la glycérine que vous ferez arriver très lentement sous la lamelle. Pour éviter plus sûrement le ratatinement des cellules déterminé par le liquide conservateur, on peut fixer les cellules, eolorées par le picro-carminate, en exposant la préparation aux vapeurs d'acide osmique (10 minutes) avant d'ajouter la glycérine. Si, après avoir dissocié les cellules de l'intestin dans l'aleool au 1/3, on eolore par une solution très faible de *bleu d'aniline dans l'eau*, et qu'on suive les progrès de la eoloration, on voit la eouche profonde du plateau des cellules se colorer, tandis que le noyau, le protoplasma et la couche superficielle du plateau sont à peine teintés.

Épithélium glandulaire. — L'élément glandulaire est repré-

senté dans l'intestin grêle par deux espèces de glandes : les glandes de *Brunner* et les glandes de *Lieberkühn*.

Les *glandes de Brunner* seront étudiées sur des coupes pratiquées sur la portion de l'intestin grêle qui se trouve être la plus voisine du pylore. On fixera, l'intestin étalé, par l'alcool et on colorera les coupes, pratiquées après l'action successive de la gomme et de l'alcool, par du picro-carminate d'ammoniaque.

Les glandes de *Lieberkühn* seront étudiées en suivant la même technique. On pourra dissocier les éléments, qui concourent à la formation de ces glandes, en faisant macérer un fragment d'intestin grêle dans l'alcool au 1/3. On chasse l'épithélium de revêtement, en brossant sa face interne avec un pinceau, puis on gratte fortement cette même face avec la lame d'un scalpel. On délaye le produit du raclage dans une goutte d'alcool au 1/3. Coloration par le picro-carminate et conservation dans la glycérine.

Tuniques de l'intestin. Villosités. — Il n'est pas besoin de technique spéciale pour observer les différentes tuniques de l'intestin. Les coupes, faites après fixation par l'alcool de l'intestin étalé, durcissement par l'action successive de la gomme et de l'alcool, coloration par le picro-carminate, fournissent des préparations très démonstratives. Les éléments musculaires, qui entrent dans la composition des villosités, se voient très bien sur des coupes totales de l'intestin, surtout, quand après avoir employé le bichromate comme fixateur, on colore par l'éosine et par l'hématoxyline. Conservation dans la résine dammar.

Vaisseaux sanguins. — Pour observer les vaisseaux sanguins de l'intestin, on emploiera la méthode que nous avons décrite quand nous avons étudié les injections. Après avoir décapité un rat, on ouvre le thorax et on introduit la canule de la seringue dans l'aorte thoracique en ayant soin de respecter le diaphragme. On pousse l'injection (masse au bleu soluble), et quand la masse revient par la veine cave, on pince cette dernière et on achève de remplir les vaisseaux. Il faut 15 c. c. environ de masse pour un petit Rat. Quand l'animal est refroidi, on ouvre l'abdomen et on le place dans le bichromate à 2 p. 100.

On fera avec l'intestin injecté, les deux préparations qui suivent :

1° Enlever avec des ciseaux des *lambeaux de villosités* que l'on examine *à plat* dans la glycérine.

2° Faire des coupes perpendiculaires à la surface, après avoir durci l'intestin par la *gomme* et l'*alcool*. Coloration par l'*hématoxyline* de Ranvier et conservation dans le *dammar*.

Vaisseaux lymphatiques. — Les méthodes, que nous allons décrire, conviennent tout spécialement pour l'étude des chylifères (1).

a. *Injection des chylifères chez le lapin.* — On commence par injecter le système vasculaire sanguin d'un lapin avec une *masse rouge au carmin*. On prend ensuite une seringue munie d'une canule piquante à biseau très court, qu'on a préalablement remplie d'une *masse au bleu de Prusse*. On pique le mésentère au voisinage de son insertion à l'intestin et on pousse l'injection. L'intestin est ensuite étalé dans une soucoupe et durci par l'alcool. Coupes perpendiculaires à la surface, conservation dans la résine dammar.

b. *Injection physiologique des chylifères du rat.* — On laisse un rat complètement à jeun pendant 24 heures puis on le nourrit avec de la graisse. On résèque, avec des ciseaux, des villosités que l'on expose aux vapeurs d'acide osmique. Conservation dans la glycérine. La graisse, qui remplit les chylifères, présente une teinte noire qui dessine admirablement la forme et le trajet des vaisseaux.

c. *Endothélium des chylifères.* — On fait la préparation que nous avons appliquée à l'injection des chylifères du lapin en employant, au lieu de la masse au bleu de Prusse, une masse de gélatine au nitrate d'argent.

Gélatiue.................................	2
Solut. nitrate d'argent à 1 p. 100...............	1

Ramollir la gélatine dans l'eau distillée ; faire dissoudre au bain-marie et ajouter la solution de nitrate d'argent.

On fera, avec l'intestin ainsi préparé, les deux préparations qui suivent :

1° Coupes perpendiculaires à la surface de l'intestin après durcissement par la gomme et l'alcool.

2° Placer un lambeau d'intestin dans l'alcool au 1/3 (24 heures), chasser l'épithélium au pinceau, détacher la tunique musculeuse et examiner la muqueuse à plat dans la résine dammar.

Nerfs de l'intestin grêle. — On choisira une anse de l'intestin

(1) RANVIER. Cours du Collège de France, *Journal de Micrographie*.

grêle du lapin pour étudier les plexus de Meissner et d'Auerbach. On injecte dans l'anse que l'on a préalablement liée à un bout, du jus de citron fraîchement exprimé et filtré sur de la flanelle. On place une ligature sous la canule qui a servi à faire l'injection, et on porte l'anse, ainsi distendue, dans quelques centimètres cubes de jus de citron. Au bout de cinq minutes on incise l'anse intestinale et on la lave rapidement dans l'eau distillée. Après quoi on la porte dans du chlorure d'or à 1 p. 100 (20 minutes), on lave rapidement et on réduit dans l'acide formique au 1/4. Faire les préparations suivantes :

1° On détache, avec une pince, la couche longitudinale de la musculeuse qui entraîne en même temps la séreuse et le *plexus d'Auerbach*. Examiner à plat dans la *glycérine*.

2° On fait macérer un lambeau d'intestin imprégné par l'or dans *l'alcool au* 1/3 (24 heures), puis, avec un scalpel, on racle la surface muqueuse de façon à enlever les villosités et la couche glandulaire. On enlève, de même, la tunique musculeuse. Il reste une membrane transparente tachetée de violet. C'est la *tunique sous-muqueuse avec le plexus de Meissner*. Examiner à plat dans la *glycérine*.

3° Enfin on fera des *coupes* perpendiculaires à la surface sur un lambeau d'intestin *imprégné par l'or* et durci par la *gomme* et *l'alcool*. Cette préparation montrera les rapports qu'affectent les fibres nerveuses entre elles.

CHAPITRE DIXIÈME

ANNEXES DE L'APPAREIL DIGESTIF

§ 1. — DENTS

Il faut faire au moins trois préparations avec les dents ; l'une avec une dent non décalcifiée, la seconde avec une dent décalcifiée et la troisième avec une dent en voie de développement.

1. **Coupe d'une dent fraîche.** — C'est une opération ennuyeuse dont on peut parfaitement se dispenser, car on trouve de fort belles coupes de dents chez les marchands d'articles de microscopie. Pour ceux qui voudraient se livrer à cette préparation, nous indiquerons la technique suivante, sur laquelle nous n'avons aucune expérience (1) : Choisissez une incisive de l'homme bien conservée et fixez-la solidement sur un étau. Avec une scie à dents très fines pratiquez une section longitudinale, puis la dent étant ainsi avivée, enlevez une tranche aussi mince que possible. Usez cette tranche entre deux pierres ponces et montez-la en employant les procédés qui vous ont servi pour préparer les coupes d'un os sec.

2. **Coupe d'une dent décalcifiée.** — Cette préparation, d'une grande simplicité, remplace avantageusement les coupes exécutées d'après la méthode précédente. Placez une dent suspendue par un fil dans le liquide de Kleinemberg.

Solution saturée d'acide picrique..............	100
Acide azotique..................................	2

Quand la décalcification est complète, ce qui arrive quand le tissu, devenu parfaitement souple, se laisse couper par le scalpel, on

(1) LATTEUX. *Manuel de Technique microscopique.*

lave longuement dans l'eau jusqu'à disparition de toute trace d'acide. On durcit la dent par la gomme et l'alcool et on fait des coupes que l'on colore par le picro-carminate d'ammoniaque.

3. **Coupe d'une dent en voie de développement.** — C'est sur un embryon de mammifère et chez un chat qui vient de naître que l'on étudiera le développement des dents. Enlevez une tranche de l'arc maxillaire inférieur large de 1 millim. environ et placez-la dans l'acide osmique à 1 p. 100 (six ou huit heures), après quoi lavez et décalcifiez dans le liquide de Kleinemberg. Vous ferez des coupes perpendiculaires au bord alvéolaire après avoir durci par la gomme et l'alcool.

§ 2. — GLANDES SALIVAIRES

C'est chez le cochon d'*Inde* ou chez le *chien* que l'on prendra le matériel nécessaire pour étudier le type séreux (parotide) et le type muqueux (sous-maxillaire) des glandes salivaires (1).

1. **Dissociation.** — Prenez un fragment de glande mesurant un ou deux millimètres d'épaisseur et placez-le pendant 24 heures dans quelques centimètres cubes d'alcool au tiers ; au bout de ce temps il suffit d'agiter le fragment de glande dans une goutte d'alcool au 1/3 pour obtenir de magnifiques cellules parfaitement isolées. Colorer au picro-carminate et couvrir d'une lamelle en faisant usage du procédé de la demi-dessiccation.

2. **Coupes.** — Il est indispensable de faire des coupes sur des fragments de glandes fixés par des réactifs variés ; nous conseillons d'exécuter les préparations suivantes :

a. Un fragment de glande est fixé par l'*alcool fort* (24 heures) puis durci par la *gomme* et l'*alcool*. Colorer les coupes par le *picro-carmin* et conserver dans la *glycérine*. Ce procédé donne de magnifiques préparations des glandes muqueuses.

b. Un fragment de glande est placé dans l'*acide osmique* (12 heures), lavé, puis durci par la *gomme* et l'*alcool*. Examiner les coupes dans l'*eau* ou bien colorer avec le *carmin aluné* et monter dans la *glycérine*.

c. Un troisième fragment est placé dans le *bichromate d'ammo-*

(1) La glande sous-maxillaire n'est pas une glande muqueuse pure.

niaque à 2 p. 100 (8 jours), lavé puis durci par la gomme et l'alcool. Colorer les coupes par l'*hématoxyline* et l'*éosine*, monter dans la résine *dammar*.

d. Enfin on fixera par le *bichromate* une glande du cochon d'Inde dont on aura injecté le système vasculaire avec une masse de gélatine au bleu de Prusse. Colorer les coupes par l'*hématoxyline* de Ranvier et monter dans le *baume*.

Si l'on veut pousser plus loin l'étude des glandes salivaires et si l'on dispose d'un chien, on fera bien de répéter l'expérience de Cl. Bernard, expérience destinée à montrer l'action de la corde du tympan sur la sécrétion salivaire. Le dispositif de l'expérience est très bien décrit dans le manuel du laboratoire de physiologie de Burdon Sanderson, nous ne saurions faire mieux que de citer le texte de cet auteur. « Immobiliser un chien, pas trop gras, à l'aide de l'appareil de Cl. Bernard et couper le poil du cou et des joues aussi court que possible. Cela fait, procéder comme il suit :

1° Incisez la peau et le peaucier le long du bord de la mâchoire inférieure à partir de son tiers antérieur, un peu en avant de l'insertion du digastrique, jusqu'à l'apophyse transverse de l'atlas.

2° Dénudez la veine jugulaire externe en la suivant jusqu'au point où elle se divise en deux branches. Disséquez ces deux branches qui se dirigent : l'une en haut derrière la glande, l'autre en avant au-dessous de la sous-maxillaire. Ces deux branches fournissent des veinules à la glande, la seconde se subdivise en deux veinules au niveau du bord antérieur de la glande.

3° Liez les deux branches de subdivision de la veine, placez une seconde ligature sur la branche supérieure au moment où elle croise la branche ascendante de la mâchoire et enlevez toute la portion située entre les deux ligatures.

4° Enlevez le tissu cellulaire qui recouvre le digastrique et remplit l'espace situé entre ce muscle et le masséter en ayant soin de ne pas blesser l'artère faciale et le conduit sous-maxillaire qui passent entre ces muscles.

5° Séparez le *digastrique* de l'*artère faciale* en vous servant de la sonde cannelée. Divisez le muscle près de son insertion au maxillaire en ménageant soigneusement le conduit et les nerfs glandulaires situés au-dessous de lui.

6° Soulevez avec une érigne le bout inférieur du digastrique et

tirez-le en arrière. Vous découvrirez ainsi un *espace triangulaire* dont le sommet est tourné en avant, la base en arrière. Des deux côtés du triangle, le *supérieur* répond au bord de la mâchoire inférieure et au masséter, l'*inférieur* répond au muscle génio-hyoïdien. La carotide pénètre dans le triangle par son angle inférieur et suit sa base. Au moment où elle passe sous le digastrique elle est croisée par le n. grand hypoglosse. On trouve à l'angle supérieur du triangle : le conduit *sous-maxillaire*, les nerfs et l'artère glandulaires qui se rendent au hile de l'organe en suivant le bord du digastrique.

7° Séparez soigneusement le digastrique des organes que nous venons de citer. Divisez ce muscle près de son insertion à la rainure digastrique,

8° Divisez le mylo-hyoïdien vers son milieu et relevez sa moitié supérieure. On voit alors le *nerf lingual* qui traverse le fond du triangle pour pénétrer dans la muqueuse buccale.

9° Suivez alors le nerf lingual en remontant vers son origine vous trouverez un petit rameau qui se détache de sa partie postérieure et qui, après avoir décrit une courbe à concavité supérieure, se dirige vers le hile de la glande en suivant le conduit salivaire; c'est la *corde du tympan* (1).

10° Après avoir trouvé la corde du tympan vous irez à la recherche du conduit de la sous-maxillaire. Ce conduit traverse d'avant en arrière le triangle dont nous avons parlé en restant étroitement accolé au conduit de la sublinguale, Il est plus gros que ce dernier et plus rapproché de la mâchoire. Vous l'isolerez avec un stylet ou avec une aiguille mousse.

11° Excitez la corde du tympan avec un faible courant d'induction et vous verrez le conduit, préalablement lié près de la bouche, se gonfler par suite de l'accumulation de la salive. Incisez-le avec des ciseaux fins et introduisez une canule que vous fixez par une ligature.

12° Si vous continuez d'exciter la corde vous verrez la salive s'écouler par la canule. C'est la preuve que la glande sécrète. Pour faire l'examen histologique de la glande excitée il faut pousser l'excitation aux dernières limites et faire marcher l'appareil d'induction pendant une heure ou une heure et demie. Après quoi vous prendrez, d'une part, des morceaux de la glande excitée, d'autre part des frag-

(1) Nous passons tout ce qui a trait à la recherche des filets sympathiques parce que cette partie de l'expérience serait sans utilité pour nous.

ments de la glande non excitée du côté opposé et vous les traiterez en suivant la technique que nous vous avons conseillé d'employer pour étudier les glandes salivaires au repos.

§ 3. — FOIE

Rien n'est plus facile que d'étudier les *cellules du foie isolées :* Prenez le foie d'un animal mort depuis plusieurs heures. Coupez-en une tranche que vous raclerez à l'aide d'un scalpel. Le produit du raclage délayé sur une lame avec une goutte de picro-carminate, vous donnera une foule de cellules parfaitement dissociées qui se montreront sous forme de petits blocs polyédriques à bords mousses. Ce sont là des éléments ayant subi des modifications cadavériques. Pour voir des cellules *fixées à l'état de vie,* il faut faire macérer dans le *sérum iodé* ou dans l'*alcool au tiers* un petit fragment de foie pris chez un animal que l'on vient de sacrifier et le racler avec un scalpel comme il a été dit plus haut. Un autre procédé plus difficile, mais infiniment meilleur, consiste à placer un petit cube de foie (1 millim. de côté) dans l'acide osmique à 1 p. 100 et à le dissocier sur une lame dans une goutte d'eau après 24 heures de séjour dans le liquide fixateur.

Coupes. — Il faut prendre certaines précautions dans la préparation du tissu hépatique, si l'on veut obtenir des coupes démonstratives. Vous choisirez tout d'abord le *foie du porc* parce que les lobules de cet animal sont nettement circonscrits par du tissu conjonctif et vous aurez soin de ne point prendre un fragment quelconque dans l'épaisseur du parenchyme. Les bobules sont plus *régulièrement orientés à la surface* que dans la profondeur, c'est donc à la surface du foie que vous prendrez les blocs de foie destinés à être coupés. Une coupe, pratiquée sur un de ces blocs et orientée de telle sorte qu'elle soit parallèle à la surface, montre la plupart des lobules sectionnés perpendiculairement à leur grand axe. Pour éviter de comprimer les tissus destinés à être coupés, vous délimiterez par quatre incisions perpendiculaires entre elles, pratiquées avec un rasoir bien tranchant, un cube de foie que vous enlèverez facilement sans le presser avec les doigts. C'est sur ce cube que vous couperez délicatement les morceaux destinés à être placé dans un liquide fixateur.

Fixateur. — Celui-ci sera choisi avec grand soin ; on a l'habitude

d'employer un des liquides suivants : l'alcool, l'acide osmique, l'acide picrique, le bichromate d'ammoniaque.

Nous ne recommandons pas l'*alcool*. Ce réactif ne donnera de bons résultats que pour les foies riches en tissu conjonctif (cirrhoses), pour les autres foies il gêne la coloration. Voici comment vous devez l'employer pour fixer le foie : un cube mesurant 1/2 à 1 centim. est placé dans de l'alcool fort (l'alcool absolu est excellent dans ce cas) où on le laisse 24 heures. On le retire de l'alcool pour le porter dans un cristallisoir plein d'eau. Après une demi-heure on le transporte dans la gomme (24 heures), puis on coagule cette dernière par l'alcool à 95° (24 à 48 heures). Coupes au microtome Ranvier ou de Malassez. Colorer au picro-carmin et conserver dans la glycérine.

L'*acide osmique* est le fixateur par excellence du tissu hépatique. Vous observerez minutieusement les règles que nous avons indiquées quand nous avons parlé de ce réactif (1), vous prendrez une languette mesurant 1 millim. de côté que vous placerez dans 3 ou 4 centim. cubes d'acide osmique à 1 p. 100. Après 24 heures de séjour dans cette solution lavez soigneusement le tissu (12 heures dans l'eau), puis achevez le durcissement par l'action successive de la gomme et de l'alcool, et coupez à *main libre* ou en vous aidant du microtome Ranvier. Les coupes dégommées seront colorées par le *carmin aluné* et conservées dans la *glycérine*.

L'*acide picrique* sera employé pour les coupes destinées à montrer la matière glycogène. Pour observer cette substance on aura recours à deux procédés : le procédé de Claude Bernard et le procédé à l'acide picrique.

1° Procédé de Claude Bernard (2) : Un fragment de foie est durci dans de l'alcool absolu additionné d'une faible quantité de potasse caustique. Les coupes, faites au sortir de l'alcool, sont colorées par le *sérum iodé fort* ou par la *solution d'iode iodurée* dont voici la formule (Ranvier) :

Eau	100
Iodure de potassium.	2.
Iode	q. s. p. saturer.

On examinera les coupes dans la solution colorante elle-même.

(1) Voyez page 28.

(2) Ranvier. Cours du Collège de France, *Journal de Micrographie.*

2° Procédé à l'acide picrique : Un fragment de foie de 1 millim. de côté est placé, encore chaud, dans 50 grammes de la solution aqueuse d'acide picrique (24 heures). On achève le durcissement par l'alcool et on place les coupes dans l'eau jusqu'à disparition complète de la couleur jaune. Colorer et examiner comme il a été dit plus haut.

Le *bichromate d'ammoniaque* à 2 p. 0/0 convient très bien pour fixer des morceaux de foie un peu volumineux. Il faut éviter cependant de dépasser 1/2 à 1 centimètre de diamètre et renouveler la solution qui devra être employée largement (150 c. à 200 c.c.) une ou deux fois pendant le temps que durera la fixation. Après une semaine de séjour dans le bichromate on lavera soigneusement la pièce dans l'eau (24 heures), puis on la durcira par l'action successive de la gomme et de l'alcool. Les coupes, dégommées, seront colorées par l'*hématoxyline* et l'*éosine* et conservées dans la résine dammar.

Injection des capillaires du foie. — On peut très bien étudier le réseau vasculaire hépatique sur un foie pris sur un rat dont on a injecté la portion sous-diaphragmatique du corps (1). Dans ce but enlevez un fragment de l'organe tout près de la surface et traitez par le *bichromate* (8 jours), puis par la gomme et par l'alcool. Faites des coupes orientées, les unes parallèlement, les autres perpendiculairement à la surface de l'organe et montez les dans la résine dammar après avoir teint les noyaux au moyen de l'hématoxyline de Ranvier.

Injection des canalicules biliaires. — Vous choisirez pour cette expérience le foie d'un lapin de moyen volume et vous prendrez comme masse à injection une solution saturée de bleu de Prusse sans gélatine. Il est très difficile d'injecter les canalicules biliaires avec la seringue ordinaire, l'appareil à pression continue dont nous avons parlé (1), donne de meilleurs résultats ; c'est donc avec lui que vous opérerez en ayant soin d'élever très faiblement la pression (4 centimètres de mercure) et de la maintenir fort longtemps (une ou deux heures).

Vous introduirez directement la canule dans le canal hépatique si vous étudiez le foie du lapin, s'il s'agit du foie d'un animal plus petit (grenouille) vous fixerez la canule sur la vésicule biliaire préalablement ouverte et vous empêcherez la masse de fuser dans l'intestin en pinçant le duodénum avec deux pinces à forcipressure. Vous injecterez avec beaucoup de profit les voies biliaires d'un foie dont

(1) Voir page 115.

le système vasculaire aura été rempli avec une masse rouge au carmin ; cette injection double du réseau biliaire et du réseau sanguin fournit de très belles préparations. L'injection des capillaires biliaires est une opération très délicate, vous ne vous découragerez donc pas si vous ne réussissez pas du premier coup.

§ 4. — VOIES BILIAIRES

C'est chez le lapin et chez le cochon d'Inde que vous étudierez la structure des gros conduits biliaires.

Vésicule biliaire. — Pour voir l'*épithélium* fendez la vésicule biliaire du lapin et placez-la dans du sérum iodé. Après 24 heures de séjour dans ce réactif grattez la face interne de cet organe avec un scalpel et délayez le produit du raclage dans une goutte de picrocarminate. Après coloration faites passer de la glycérine sous la lamelle.

Les *glandes* de la vésicule biliaire existent en assez grand nombre chez le cobaye. Après avoir fait écouler la bile qui la distend vous injecterez la vésicule avec de l'alcool fort, puis vous la laisserez pendant environ 12 heures dans un bain de ce même fixateur. Vous fendrez alors la vésicule et vous l'inclurez dans la celluloïdine afin de rendre plus faciles les coupes de la membrane qui forme les parois de l'organe. Colorez avec du picro-carminate.

Les fibres *musculaires* seront étudiées en suivant exactement la technique que nous avons appliquée à l'examen de la vessie de la grenouille (page 88).

Le *plexus nerveux* devient très évident si on emploie la méthode suivante : Faites écouler la bile et injectez, dans la vésicule, du jus de citron fraîchement exprimé et filtré sur de la flanelle. Placez ensuite la vésicule dans quelques centimètres cubes de jus de citron où vous la laisserez cinq ou six minutes. Après quoi fendez-la dans l'eau distillée et portez-la dans le chlorure d'or (20 minutes). Lavez de nouveau et réduisez dans l'acide formique au quart (1). Examinez des fragments de vésicule dans la glycérine après avoir chassé l'épithélium par le pinceau.

(1) Voyez méthode d'imprégnation par l'or, page 87.

Le *canal cholédoque*, ainsi que les conduits hépatique et cystique, seront étudiés sur des coupes tranversales après fixation par l'alcool et inclusion dans la gomme. Colorez les coupes par le picro-carminate et conservez-les dans la glycérine neutre ou acide.

§ 5. — PANCRÉAS

Le pancréas sera étudié en suivant la technique employée pour l'observation des glandes salivaires.

On *dissociera* les cellules glandulaires en faisant macérer des fragments de l'organe dans *l'alcool au tiers* ou dans le *sérum iodé*.

On fera des *coupes* après fixation par l'alcool, par l'acide osmique ou par le bichromate d'ammoniaque.

On pourra compléter l'étude de cet organe en employant la méthode de Gibbes qui donne une bonne différenciation des cellules. Les coupes, pratiquées après l'action du bichromate d'ammoniaque, sont colorées pendant dix minutes dans la solution suivante :

Eau distillée...........................	100 gr.
Vésuvine................................	5

on les lave rapidement dans l'eau puis on les colore par :

Eau distillée...........................	100 gr.
Carmin d'indigo.........................	5

Quand elles ont pris une teinte bleu foncé, on les lave dans l'eau puis on les monte dans le dammar en suivant la méthode habituelle.

CHAPITRE ONZIÈME

APPAREIL RESPIRATOIRE

§ 1. — MUQUEUSE DES FOSSES NASALES

Il est indispensable d'étudier la muqueuse des fosses nasales dans des régions différentes afin de se rendre compte des variations de structure que présente cette membrane. Vous en prendrez un lambeau sur la partie supérieure de la cloison (région olfactive) et un autre à sa partie inférieure et vous ferez les préparations suivantes :

1re *préparation.* — Dissociation des cellules épithéliales. Placez un fragment de muqueuse mesurant 1 c. environ dans l'alcool au 1/3. Après 24 heures de séjour dans ce liquide grattez la surface de la muqueuse avec la lame d'un scalpel et délayez le produit du raclage dans une goutte d'alcool au tiers. Colorez avec du picro-carminate, couvrez d'une lamelle en employant le procédé de la demi-dessiccation. Après avoir examiné les cellules épithéliales montées dans la solution colorante, faites passer de la glycérine sous la lamelle en ayant soin de rendre la pénétration très lente.

2e *préparation.* — Coupes. Il est bon de faire deux séries de coupes :

a. Les unes, après fixation de la muqueuse par l'alcool. Un fragment de la pituitaire est placé dans l'alcool fort (24 heures), puis durci par la gomme et l'alcool. Les coupes colorées au picro-carminate sont conservées dans la glycérine.

b. Les autres, après fixation par l'acide osmique. Placez dans la solution d'acide osmique à 1 p. 100 un millimètre carré de muqueuse. Après 24 heures de séjour dans le liquide fixateur, lavez soigneusement (12 heures) puis durcissez par la gomme et l'alcool. Les coupes, colorées par le carmin aluné, sont conservées dans la glycérine.

§ 2. — LARYNX

Le larynx présente à étudier, une charpente, des ligaments, des muscles et une muqueuse. L'étude de la *charpente*, constituée par des cartilages, ne réclame pas une technique différente de celle que nous avons indiqué pour l'étude du tissu cartilagineux. Nous en dirons autant des *muscles* et des *ligaments*.

La muqueuse nous occupera exclusivement. On prendra cette membrane sur le larynx d'un animal que l'on vient de sacrifier, et on la placera rapidement dans les liquides appropriés, sans la laisser sécher. Si l'on dispose d'un larynx enlevé à un homme une demi-heure ou une heure après la mort, on aura soin de ne pas laisser échapper cette occasion et on prendra cette muqueuse qui représente un objet d'étude fort remarquable.

1re *préparation.*—*Dissociation* des cellules de l'épithélium après macération dans l'*alcool au tiers*, ou dans le *sérum iodé faible*, en suivant la technique indiquée pour l'examen de l'épithélium olfactif.

2e *préparation.* — Coupes. On fera des coupes perpendiculaires à la surface. Nous conseillons d'employer comme fixateur : l'*alcool*, l'*acide osmique*, le *bichromate d'ammoniaque*. On durcira comme d'habitude par la gomme et l'alcool, puis on colorera les coupes en employant les teintures appropriées à chacun de ces fixateurs, le *carmin aluné* après l'*acide osmique;* le *picro-carmin* après l'*alcool* ; l'*hématoxyline* après le *bichromate*.

Rien à ajouter pour l'examen des parties constituantes de la *trachée* et des *bronches*. Les méthodes précédentes conviennent admirablement pour cette étude.

§ 3. — POUMONS

L'*endothélium* des alvéoles pulmonaires peut être très facilement mis en évidence, si on a soin de prendre le poumon d'un animal que l'on vient de sacrifier.

1re *préparation.* — C'est à la grenouille qu'il convient de s'adres-

ser tout d'abord ; le poumon, extrêmement simple de cet animal, permet de voir la disposition des cellules épithéliales dans toute leur simplicité. Ouvrez la cavité abdominale d'une grenouille immobilisée par la section du bulbe ; puis, au moyen d'une pipette introduite dans la glotte, injectez dans les poumons une solution de nitrate d'argent à 1 p. 300. Fermez la pipette avec le doigt, de façon à maintenir les poumons distendus par le liquide, et exposez le tout à la lumière du soleil. Quand les poumons ont pris une teinte brune, réséquez les deux sacs pulmonaires et portez-les dans un cristallisoir rempli d'eau où vous les fendrez. Colorez les noyaux des cellules endothéliales avec le carmin aluné, puis étalez soigneusement le poumon sur une lame, la face interne en haut, en employant le procédé de la demi-dessiccation. Déshydratez à plusieurs reprises, par de l'alcool absolu ; remplacez ce dernier par une goutte d'essence de bergamote, et montez dans la résine dammar.

2e *préparation.* — Il faut modifier légèrement la technique précédente pour observer l'endothélium du poumon des mammifères. Ouvrez la cage thoracique d'un rat ou d'un lapin et laissez l'animal mourir pas asphyxie. Injectez, par la trachée, une solution de nitrate d'argent à 1 p. 300, de façon à distendre légèrement les poumons. Quand ceux-ci, exposés à la lumière solaire, sont devenus opalescents, faites ressortir le nitrate d'argeut en exerçant une légère pression sur l'organe. Insufflez alors le poumon par la trachée, liez ce conduit et suspendez l'organe distendu dans un endroit sec. Au bout de 24 à 48 heures la dessiccation est suffisante pour que l'on puisse couper avec un rasoir de petites tranches parallèles à la surface de l'orgaue que l'on montera dans la résine dammar (1).

3e *préparation.* — Pour voir la disposition générale du lobule pulmonaire et des bronches il faut faire des coupes sur le poumon d'un animal qui n'a pas encore respiré. Choisissez un enfant mort quelques instants après sa naissance, ou un fœtus que vous culevez directement de l'utérus un ou deux jours avant le terme (le chat convient très bien pour cette étude). Ouvrez la cavité thoracique pour enlever les poumons, coupez ceux-ci en tranches mesurant un demi-centimètre de diamètre et placez-les dans la solution saturée d'acide picrique. Après un séjour de 24 heures dans ce réactif, lavez à l'al-

(1) Ces procédés sont indiqués par le professeur Ranvier dans son Traité technique.

cool fort (5 ou 6 heures) puis durcissez par la gomme et l'alcool. Les coupes, pratiquées perpendiculairement et parallèlement à la surface du poumon, seront débarrassées de la gomme et de l'acide picrique par un séjour prolongé dans l'eau, puis colorées par le picro-carminate. Conservation dans la glycérine.

4e *préparation.* — Quand on aura fait les exercices précédents on pourra étudier avec fruit les coupes du poumon de l'homme adulte. Il est bon de prendre certaines précautions dans la préparation des morceaux de poumons destinés à l'examen microscopique, sans quoi on obtiendrait de mauvaises coupes. Nous les indiquerons rapidement en priant le lecteur de chercher le détail de la technique dans les chapitres de la technique générale.

a. Prendre un fragment de poumon mesurant un centimètre de côté au plus. Enlever la pièce avec un rasoir en ayant bien soin de ne pas la comprimer.

b. Fixer par le bichromate d'ammoniaque à 2 p. 100 ou par le liquide de Müller. Il faut que la pièce reste au moins 8 jours dans ce réactif. Après quoi on la lavera soigneusement dans l'eau (24 heures).

c. Inclure dans la gomme en ayant soin de prendre une *solution très claire* qu'on laissera s'épaissir peu à peu. Il faut laisser la pièce dans la gomme additionnée d'acide phénique ou d'un cristal de thymol, *pendant* 48 *heures ou même d'avantage.*

d. Éponger la pièce avec du papier buvard et coaguler la gomme par l'alcool à 95°, qu'on renouvellera si le besoin s'en fait sentir.

e. Les coupes, exécutées à l'aide d'un microtome, seront colorées par l'*éosine* et l'*hématoxyline,* et montées dans la résine dammar (1).

5e *préparation.*— Il nous reste à prendre connaissance du réseau capillaire du poumon. Les préparations que nous avons indiquées pour l'étude de la *circulation capillaire* (page 116) et de l'*endothélium des capillaires* (page 114) vous fourniront un objet d'étude qu'il ne faut pas négliger. Il nous reste à faire connaître les méthodes d'injection du réseau pulmonaire ; ces méthodes sont au nombre de deux : l'injection *naturelle par le sang,* et l'injection avec une *masse colorée.*

(1) Si l'on veut voir très nettement les fibres élastiques, on colorera les coupes par un séjour prolongé dans le picro-carminate, puis on les montera dans le mélange de glycérine, d'acide picrique, et d'acide formique dont la formule a été donnée plus haut. Voyez page 108.

a. *Injection naturelle.* — On peut faire cette expérience avec le poumon de la grenouille, ou avec le poumon de l'homme. On ouvre largement la cavité abdominale d'*une grenouille* de façon à faire sortir le poumon au dehors, puis au bout de quelques instants, quand cet organe s'est congestionné, on place une ligature à sa base, et on porte l'organe distendu par l'air dans du bichromate à 2 p. 100. Après 24 heures de séjour dans cette solution, on fend le poumon qu'on laisse encore quelques heures dans le fixateur, puis on l'étale soigneusement sur une lame, la face interne étant dirigée en haut. Coloration par l'éosine et l'hématoxyline, conservation dans la résine dammar. S'il s'agit du *poumon de l'homme*, il est évident qu'on ne peut pas y déterminer une congestion artificielle. il faut avoir recours à un poumon congestionné, tel qu'on le trouve chez les individus morts de fièvre typhoïde. On place des morceaux de ce poumon dans du bichromate, où on le laisse séjourner 8 ou 10 jours. Lavages dans l'eau ; durcir par la gomme et l'alcool ; colorer par l'éosine et l'hématoxyline ; conserver les coupes dans la résine dammar.

b. *Injection avec une masse colorée.* — C'est la gélatine au bleu de Prusse soluble qui mérite la préférence ; vous pousserez l'injection par l'artère pulmonaire, et vous traiterez le poumon comme les autres organes injectés au bleu (page 113).

CHAPITRE DOUZIÈME

ORGANES URINAIRES

§ 1. — REINS

L'étude technique du rein présente des difficultés telles que nous serons forcés de faire plusieurs préparations destinées à montrer, séparément, la constitution de chacun des nombreux éléments qui entrent dans la composition de cet organe. Après avoir étudié la technique générale applicable aux coupes du tissu rénal, nous étudierons l'épithélium des tubes contournés, la structure du glomérule, les espaces intertubulaires, et, en dernier lieu, les méthodes d'injection des tubes urinifères et des vaisseaux sanguins.

1re *préparation.* — Coupes du rein. Nous conseillons de ne pas employer l'*alcool* pour fixer le tissu rénal, ce réactif produit des altérations considérables et gêne la coloration. C'est le *bichromate d'ammoniaque* et l'*acide osmique* qui vous fourniront les meilleurs résultats. Quand vous aurez à faire l'examen d'un rein, coupez-en un cube d'un centimètre de diamètre à l'aide d'un rasoir bien tranchant, en orientant convenablement la pièce, et en ayant soin de ne pas la comprimer. Sur ce cube prenez une languette de 1 millm. d'épaisseur et placez-la dans l'*acide osmique* à 1 p. 100. Jetez le reste de la pièce dans du *bichromate d'ammoniaque.*

Le morceau placé dans la *solution d'osmium* y séjournera 24 heures. Au bout de ce temps laver soigneusement et durcir par la gomme et l'alcool. Les coupes. pratiquées perpendiculairement à la surface de l'organe, seront colorées par le carmin aluné et conservées dans la glycérine.

Le cube placé dans le *bichromate* sera abandonné dans ce réactif pendant au moins 8 ou 10 jours. Laver, durcir par la gomme et l'al-

cool. Les coupes, colorées par l'hématoxyline et l'éosine, seront conservées dans la résine. Il est bon de faire deux séries de coupes : les unes parallèles, les autres perpendiculaires à la surface du rein.

2e *préparation.*— Épithélium des tubes contournés. Si on cherche à fixer l'épithélium des tubes contournés par l'alcool, par les bichromates et même par la solution d'acide osmique à 1 0/0 il se produit au sein de ces éléments, des altérations qu'il est indispensable d'observer soigneusement. La striation des cellules est à peine visible, la cellule se rétracte en expulsant dans le tube une ou plusieurs boules sarcodiques. L'épithélium strié est creusé de vacuoles qui lui donnent l'aspect de cellules caliciformes. Voici quelles sont les règles à observer pour l'examen de la striation dans le rein des *mammifères.*

a. Prendre le rein d'un animal *immédiatement* après la mort.

b. A l'aide d'un rasoir bien tranchant, couper, près de la surface de l'organe, une tranche de 1 millim. de côté au plus.

c. Fixer par les vapeurs d'*acide osmique* (2 heures) et porter la tranche dans l'*alcool fort* (sans laver) pour complèter le durcissement.

d. Examiner les coupes dans l'eau.

Les cellules striées du rein des batraciens ont plus de résistance que celles des mammifères, il ne sera pas nécessaire d'employer la technique précédente pour voir les bâtonnets. Placer un rein de grenouille ou mieux de *triton* dans l'alcool absolu ; quand le durcissement sera suffisant, faites des coupes très fines que vous examinerez dans la solution colorante elle-même. Les stries des cellules sont très nettes.

Il est possible d'isoler les cellules épithéliales du rein en procédant de la manière suivante. On fend, par le milieu, un rein de grenouille que l'on fait macérer dans le sérum iodé faible (24 heures). Au bout de ce temps, on retranche un fragment de l'organe avec des ciseaux courbes et on l'agite dans une goutte de picro-carminate. On obtient ainsi une foule de cellules parfaitement isolées.

3e *préparation.*— Endothélium de la capsule de Bowman. C'est à la méthode d'imprégnation par le nitrate d'argent qu'il faut avoir recours pour démontrer l'existence de l'endothélium capsulaire. Voici d'après MM. Renaut et Hortolès la méthode qu'il convient de suivre : « Un lapin est sacrifié par la section du bulbe ; le ventre est ouvert l'artère et la veine émulgente ainsi que l'uretère sont soigneusement isolés.

On place une canule dans l'artère et l'on fait passer dans l'artère un courant de sérum artificiel (solution physiologique de sel, voir p. 64) destiné à chasser complètement le sang sans altérer les endothéliums. On sait en effet que les endothéliums et d'une manière générale les parties vivantes continuent à vivre quelque temps dans le sérum artificiel. Quand le liquide, injecté très doucement (il convient de se servir de l'appareil à pression continue et de ne pas dépasser 4 centim.), ressort entièrement incolore par la veine, on substitue au courant de sérum un courant d'eau distillée. Le chlorure de sodium est très rapidement expulsé et si l'on a agi avec la célérité nécessaire, le courant d'eau ne détermine aucune lésion des épithéliums. On fait alors passer dans le rein un courant de nitrate d'argent à 1 p. 500. Immédiatement on voit l'organe blanchir par points ; quelques minutes suffisent pour que l'imprégnation soit suffisante; de cette façon tous les lobules de la substance corticale du rein ne sont pas imprégnés, mais les systèmes lobulaires qui le sont se détacheront avec une extrême netteté sur ceux qui ne le sont pas. Pour terminer l'opération on fait de nouveau passer un courant d'eau distillée puis on lie l'artère, la veine et l'uretère; on enlève le rein avec son conduit excréteur et on le suspend dans environ 300 grammes d'alcool à 90° C. Très rapidement l'alcool coagule la surface du rein, de telle sorte que l'organe est enveloppé dans une coque rigide : les vaisseaux injectés, les capsules de Bowman, les portions corticales des systèmes de tubes contournés atteints par l'imprégnation ne se rétracteront plus et le durcissement pourra se poursuivre régulièrement de telle sorte qu'au bout de 24 heures on pourra pratiquer des coupes minces et régulières dans la substance corticale et dans la substance médullaire. Ces coupes, montées dans la glycérine ou dans la résine dammar, montrent les vaisseaux, les glomérules, les capsules de Bowman et l'origine des tubes contournés à la fois imprégnés d'argent et distendus comme s'ils avaient été insufflés. »

4e *préparation*. — Cette préparation servira à démontrer la couche de protoplasma qui tapisse la surface du glomérule. « Un rein de lapin est injecté avec une masse au bleu de Prusse et à la gélatine (le procédé sera indiqué plus loin) puis fixé dans une solution de bichromate à 2 p. 100 (on aura soin de fendre le rein en plusieurs endroits dès que la masse sera refroidie afin d'assurer la pénétration rapide du bichromate), puis durci à l'aide de la gomme et de l'alcool.

On fait des coupes très minces soit parallèles, soit normales à la surface du rein en suivant la direction des irradiations médullaires. On colore les coupes soit par le *picro-carminate* d'ammoniaque (24 heures de séjour dans ce colorant) soit par le *rose de Magdala* (quelques gouttes d'une solution alcoolique saturée dans un verre de montre rempli d'eau). Dans les préparations *injectées au bleu* colorées au *rose de Magdala* et observées dans l'eau, les noyaux propres des capillaires sont noyés dans la masse bleue, les noyaux des cellules qui enveloppent le glomérule sont teints en violet pur et le protoplasma de ces cellules est coloré en rose amarante.

5e *préparation.* — Injection du système vasculaire. Cette préparation est extrêmement simple. Il n'est même pas besoin de manipulation spéciale, les reins d'un rat dont on a injecté la portion sous-diaphragmatique du corps sont très souvent injectés d'une façon remarquable. Enlevez un de ces reins, fendez-le et placez-le dans le bichromate d'ammoniaque. Au bout de huit ou dix jours lavez le rein, complétez le durcissement par la gomme et l'alcool. Les coupes, colorées par le carmin aluné, seront montées dans la résine. Il est bon d'avoir deux séries de coupes, les unes parallèles, les autres perpendiculaires à la surface du rein.

6e *préparation.* — Injection des canalicules urinaires. C'est là une opération extrêmement délicate qu'on ne réussira qu'après de nombreux essais. Voici deux méthodes qui fournissent des résultats convenables.

a. *Procédé de Chrzonczewski.* — Le procédé consiste à injecter dans les vaisseaux d'un animal une matière colorante qui s'élimine par les reins. Cet auteur choisit une solution ammoniacale de carmin entièrement dépourvue de granulations (1) : un lapin étant immobilisé à l'aide d'un appareil à contention, on met à nu la jugulaire sur laquelle on place une ligature et on ouvre le bout périphérique. On laisse écouler 15 ou 20 gr. de sang, on lie le bout périphérique puis on injecte, par le bout central, 15 à 20 gr. de la solution de carmin. Au bout d'une heure et demie ouvrir l'abdomen, lier l'uretère, ouvrir l'artère et la veine rénales et pousser par l'artère une injection de chlorure de sodium à

(1) Voici la formule indiquée par Ranvier (Traité technique) :

Eau distillée	30
Carmin	3
Ammoniaque	1,50

1 p. 200. Placer la pièce dans l'alcool absolu et faire des coupes perpendiculaires à la surface du rein.

b. *Injection de l'uretère.* — Cette opération, bien plus difficile que la précédente, doit être pratiquée chez le chien. On enlève le rein à un animal que l'on vient de tuer en ayant soin de conserver un bout d'uretère, puis on charge l'appareil à pression continue avec une masse au bleu de Prusse sans gélatine et on introduit la canule que l'on fixe dans l'uretère à l'aide d'une ligature. La pression doit être très faible, 5 ou 6 c.c. de mercure et maintenue pendant une ou deux heures. L'organe est placé dans du bichromate puis durci par la gomme et l'alcool. Le plus souvent il n'y a que quelques points du rein qui soient convenablement injectés.

§ 2. — BASSINET ET URETÈRE

1re *préparation.* — Dissociation des cellules épithéliales. Fendez un segment de l'uretère ou du bassinet et faites-le macérer pendant 24 heures dans l'alcool au tiers ou dans le sérum iodé faible, grattez la face interne avec la lame d'un scalpel et délayez le produit du raclage dans une goutte d'alcool au tiers. Colorez par le picro-carminate, couvrez avec une lamelle et conservez dans la glycérine.

2e *préparation.* — Coupes. Pratiquez des coupes longitudinales et transversales sur l'organe fixé par l'alcool et durci par la gomme et l'alcool. Coloration au picro-carminate.

§ 3. — VESSIE

Pour étudier convenablement la vessie, il est indispensable de distendre ses parois avec le réactif dont ont veut faire usage.

1. Chez les animaux pourvus d'un cloaque, nous avons en vue la grenouille qui sert généralement pour les études histologiques, on procédera de la manière suivante : Liez la fente du cloaque à l'aide d'un lien solide, ouvrez la cavité abdominale et cherchez l'extrémité terminale du gros intestin. Introduisez une canule vers l'extrémité périphérique de ce conduit et poussez doucement l'injection. Le liquide s'accumule dans le cloaque et reflue dans la vessie. Quand cet organe est convenablement distendu, liez le gros intestin, détachez

les membres postérieurs de la grenouille avec la vessie et l'intestin puis placez le tout dans une grande quantité du liquide qui a servi à faire l'injection. Voici les préparations que l'on fera utilement avec la vessie de la grenouille :

1re *préparation*. — Injecter de l'alcool au tiers ; après 24 heures racler la face interne de l'organe avec la lame d'un scalpel, délayer le produit du raclage dans une goutte d'alcool au tiers. Coloration au picro-carminate et conservation dans la glycérine. (Cellules épithéliales isolées.)

2e *préparation*. — Muscles. La vessie précédente dont l'hépithélium aura été soigneusement chassé par le pinceau, sera étalée sur une lame la face interne tournée en haut. Coloration par l'hématoxyline et l'éosine, conservation dans la résine dammar. Le détail de cette préparation a été donné page 88.

3e *préparation*. — Vaisseaux. Injectez une grenouille avec la solution de nitrate d'argent à 1 p. 300, comme il a été dit pour la préparation des vaisseaux du poumon. Remplissez la vessie avec de l'alcool au tiers, chassez l'épithélium au pinceau et montez la vessie dans le dammar, la face interne tournée en haut, après l'avoir exposée à la lumière directe du soleil.

4e *préparation*. — Nerfs. Injectez, dans la vessie, du jus de citron puis du chlorure d'or à 1 p. 100. Réduisez dans l'acide formique au quart et examinez à plat. On consultera, pour faire cette manipulation, la technique indiquée pour l'étude de la terminaison des nerfs dans les fibres musculaires lisses.

5e *préparation*. — Coupes. Injectez dans la vessie de l'acide osmique à 1 p. 100. Au bout de quelques minutes, les parois étant fixées à l'état de distension, fendez la vessie et placez-la pendant une demi-heure dans la solution d'osmium. Lavez, durcissez par la gomme et l'alcool ; faites des coupes normales à la surface que vous colorerez avec le carmin aluné et que vous conserverez dans la glycérine.

2. Il est extrêmement facile d'injecter la vessie des *mammifères* pour la fixer à l'état de distension. Introduisez la canule de votre seringue dans l'urèthre et ouvrez la cavité abdominale en ayant soin de ne pas blesser la vessie. Poussez fortement l'injection et quand vous jugerez la distension suffisante placez une ligature à la base de l'organe et réséquez la vessie au-dessous de cette ligature. Voici les préparations les plus intéressantes :

1re *préparation.* — Épithélium. Injectez de l'alcool au tiers et suivez la méthode employée pour l'étude de l'épithélium de la grenouille.

2e *préparation.* — Injectez dans la vessie de l'alcool à 95° et placez l'organe dans cinquante centim. cubes de ce même alcool. Au bout de 24 heures fendez la vessie et durcissez par la gomme et l'alcool. Coupes normales à la surface; coloration au picro-carminate et conservation dans la glycérine.

Il est indispensable de prendre la vessie d'un animal fraîchement tué, sans cela la couche épithéliale n'existerait plus dans les coupes. La vessie du lapin constitue un excellent objet d'étude.

§ 4. — URINE

L'examen de l'urine présente une importance considérable, aussi nous insisterons sur les méthodes destinées à l'observation des éléments figurés que ce liquide normal ou pathologique peut tenir en suspension.

Méthode générale pour l'examen de l'urine. — Lorsqu'on doit faire l'examen microscopique de l'urine, il faut recueillir ce liquide dans un vase bien propre puis le transvaser dans un verre de forme conique. Par le repos les éléments, en suspension dans le liquide se déposent lentement au fond du vase. Quand il n'y a que peu d'éléments figurés, un repos de 12 à 14 heures est nécessaire pour que les sédiments puissent s'amasser dans la partie effilée du verre; si au contraire les matières en suspension sont très abondantes, on peut faire l'examen au bout d'une heure ou deux. Prenez une pipette à pointe longue et effilée et tandis que vous fermez sa grosse extrémité avec la pulpe de l'index, introduisez-la doucement dans l'urine jusqu'à ce que vous arriviez au milieu des couches qui renferment les sédiments. Retirez le doigt qui ferme le gros bout de la pipette et, quand l'urine a pénétré dans le tube, placez de nouveau votre doigt pour fermer le gros bout et retirez la pipette. Déposez une goutte aussi petite que possible sur le porte-objet et couvrez d'une lamelle. Il ne faut pas se préoccuper des bulles d'air qui peuvent se trouver dans le champ de la préparation; loin d'être nuisibles elles servent utilement pour la mise au point. Il faut éviter soigneusement de por-

ter sur la lame une trop grande quantité d'urine. Vous vous exposeriez à voir le liquide refluer au-dessus du couvre-objet et mouiller l'objectif, ce qui rendrait l'examen impossible. Si malgré tous vos soins, cet ennui se produisait, vous devriez enlever l'excès d'urine à l'aide d'un petit morceau de papier filtre. Examinez d'abord la préparation avec un faible grossissement et ne prenez un objectif fort que quand vous aurez obtenu une vue d'ensemble. Ne vous contentez pas d'une seule préparation et faites de nombreux examens avant d'annoncer un résultat surtout quand ce dernier est négatif.

1re *préparation.* — Examen rapide. Recueillir dans des vases distincts de l'urine rendue après un repas copieux. Laisser reposer ce liquide dans un endroit frais et examiner le dépôt. Il est bon de répéter cet examen à plusieurs reprises, à des intervalles plus ou moins longs après la miction, de façon à étudier les éléments de l'urine fraîche et ceux qui s'y forment par la fermentation.

2e *préparation.* — Éléments organiques destinés à être conservés (cylindres, cellules épithéliales, globules blancs, etc.). C'est le procédé indiqué par Cornil et Ranvier (1) qui mérite la préférence. « Après avoir laissé déposer le sédiment urinaire dans un verre à expérience, on en prend avec une pipette un centimètre cube et on le verse dans un tube à urine en y mêlant une quantité égale de la solution d'acide osmique au centième. Vingt-quatre heures après on remplit le tube avec de l'eau distillée, on agite et on laisse reposer. Dans le dépôt tous les cylindres ont pris une teinte brune ou noirâtre plus ou moins foncée. Les plus minces sont très manifestes bien qu'ils n'aient qu'une teinte grise très pâle. Les cylindres hyalins sont noirâtres ou presque noirs. La forme de ces cylindres est parfaitement. conservée parce que l'acide osmique les a fixés et coagulés en même temps qu'il les colorait.

Dans les préparations suivantes nous allons indiquer la manière de préparer les cristaux de différents corps chimiques que l'on est exposé à rencontrer parmi les sédiments urinaires.

3e *préparation.* — Urée. Évaporez au bain-marie 100 c. c. d'urine jusqu'à ce que le volume du liquide soit réduit à 15 c. c. Refroidissez à 0°, et ajoutez de l'acide azotique concentré non fumant. Il se forme un précipité de nitrate d'urée; filtrez, dissolvez le préci-

(1) Manuel d'Histologie pathologique.

pité dans l'eau bouillante et portez une goutte de la solution sur une lame porte-objet. Le *nitrate d'urée* cristallise par refroidissement sous forme de petites lamelles rhomboïdales.

Voici un procédé excellent pour la recherche de l'urée dans des liquides organiques autres que l'urine : ajoutez au liquide trois à quatre fois son volume d'alcool, après quelques heures de repos, filtrez et évaporez au bain-marie. Avec une pipette, prenez une goutte de la solution concentrée et déposez-la sur une lame. Placez, au milieu de la goutte, un brin de fil, couvrez d'une lamelle, faites passer de l'acide nitrique sous le couvre-objet. Les cristaux d'azotate d'urée se forment des deux côtés du fil.

4e *préparation.* — Acide urique, urates. Prenez une parcelle du dépôt rouge brique qui s'attache au fond et aux parois des vases à la suite d'un mouvement fébrile et examinez dans une goutte d'urine. Ce sédiment est formé d'un mélange d'urates (urates de soude et de potasse) et d'acide urique. Ces cristaux se dissolvent lorsqu'on chauffe la préparation. Si alors on fait passer une goutte d'acide chlorhydrique sous la lamelle les cristaux d'acide urique se précipitent.

Le procédé suivant permettra d'obtenir des cristaux d'acide urique extrêmement beaux. Mélangez dans une éprouvette peu profonde, 200 c. c. d'urine avec 2 à 3 c. c. d'acide azotique pur. Au bout de 24 heures, il se dépose un sédiment, rouge brique ou brun, formé par des cristaux d'acide urique colorés par le pigment de l'urine. Sous le microscope, ces cristaux présentent les formes les plus variées : la plus commune est celle de tables rhomboïdales.

5e *préparation.* — Acide hippurique. On trouve assez rarement de l'acide hippurique dans l'urine de l'homme ; c'est, de l'urine d'un herbivore qu'il faut retirer l'acide hippurique pour en faire une préparation d'étude. « Faites chauffer au bain-marie 200 c. c. d'urine de vache jusqu'à ce qu'elle soit réduite à 40 c. c. Ajoutez de l'acide chlorhydrique et laissez reposer jusqu'au jour suivant. Une grande quantité d'acide hippurique s'est séparée de la liqueur sous forme d'une masse cristalline brune. Lavez la masse cristallisée à l'eau froide et pressez-la entre des doubles de papier filtre. Dissolvez ensuite dans une quantité d'eau bouillante aussi petite que possible, ajoutez du charbon animal pur et filtrez. Concentrez la liqueur et prenez une goutte de la solution que vous laisserez cristalliser sur un

porte-objet » (1). L'acide se montre sous forme de prismes incolores à quatre faces, terminées par deux ou quatre facettes.

6e *préparation.* — Oxalate de chaux. L'urine humaine renferme quelquefois des cristaux d'oxalate de chaux. La préparation est extrêmement simple. Laissez reposer l'urine et examinez les sédiments dans une goutte de ce liquide. Les cristaux sont caractéristiques : petits octaèdres, brillants, assez réguliers qu'on peut comparer à des enveloppes de lettres. Quelques-uns présentent la forme de sabliers. Ces cristaux sont insolubles dans l'eau et dans l'acide acétique; ils se dissolvent dans les acides minéraux. On peut s'assurer de cette réaction en faisant passer sous la lamelle une goutte d'acide chlorhydrique.

7e *préparation.* — Phosphates. Si l'urine est alcaline, chauffez une certaine quantité de ce liquide dans un tube à réaction ; si elle est neutre ou acide ajoutez un peu de lessive de potasse avant de chauffer. Sous l'influence de la chaleur les phosphates se séparent sous forme de flocons peu denses, gris blanchâtres, assez caractéristiques. Les phosphates se précipitent également quand on abandonne l'urine à la fermentation alcaline.

8e *préparation.* — Cystine. On la trouve rarement parmi les sédiments de l'urine. L'examen microscopique se fait très facilement en portant sur une lame une goutte du dépôt formé par une urine contenant de la cystine. Un excellent moyen pour se procurer des cristaux types de ce corps consiste à dissoudre un calcul de cystine dans de l'ammoniaque et à laisser évaporer une goutte de la solution sur une lame. Ce sont des tablettes incolores, régulières, hexagonales insolubles dans l'eau, l'alcool, l'éther, solubles dans l'ammoniaque.

9e *préparation.* — Leucine et tyrosine. Ces deux corps n'existent pas dans l'urine normale; mais leur présence a été constatée dans plusieurs maladies graves (atrophie jaune aiguë du foie). Dans ces cas il est de règle de les trouver associés, ils remplacent, dans une proportion considérable, l'urée qui est considérablement diminuée. Quand ils existent en grande abondance la recherche est extrêmement simple. Examinez, avec un fort grossissement, une goutte du dépôt formé par l'urine et vous verrez des cristaux de leucine et de tyrosine. Dans le cas contraire il faut, pour les obtenir, concentrer l'urine en la chauffant au bain-marie, puis laisser refroidir.

(1) Burdon Sanderson. Laboratoire de physiologie.

Les cristaux de leucine se montrent sous forme de globules qui ressemblent à de grosses gouttes de graisse colorée en brun. A l'aide d'un fort grossissement on peut y reconnaître des anneaux concentriques ainsi qu'une fine striation rayonnée. Ces cristaux sont insolubles dans l'éther, ils se dissolvent facilement dans la potasse et dans l'acide chlorhydrique.

Les cristaux de tyrosine se montrent sous la forme d'aiguilles soyeuses réunies en touffes ou en rosaces.

10e *préparation.* — Hémoglobine. Quand l'hémoglobine est en solution dans l'urine, comme il arrive dans l'hémoglobinurie, on peut employer le procédé suivant : Prenez quelques centimètres cubes d'urine auxquels vous ajouterez un demi-volume de lessive de soude au tiers. Chauffez dans un tube jusqu'à ébullition. S'il y a du sang le liquide prend une coloration vert bouteille et les phosphates se précipitent, entraînant la matière colorante du sang. Filtrez et recueillez le précipité sur un filtre. Déposez, sur le porte-objet, une petite quantité du précipité avec une goutte d'acide acétique glacial et un cristal de chlorure de sodium. Chauffez doucement jusqu'à formation de bulles, laissez refroidir et vous aurez les cristaux caractéristiques d'hémine.

CHAPITRE TREIZIÈME

APPAREIL GÉNITAL MALE

§ 1. — TESTICULES

Les préparations histologiques du testicule sont très difficiles à obtenir et à interpréter, il ne faut donc pas se décourager si l'on n'arrive pas du premier coup à un résultat convenable.

Prenez les testicules d'un rat adulte que vous venez de sacrifier. Fendez les, sans les comprimer, avec un rasoir bien tranchant et placez chacune des moitiés dans les liquides destinés à faire les préparations suivantes :

1re *préparation.* — Coupes. Acide osmique à 1 p. 100 (24 heures), lavez soigneusement, durcissez par la gomme et l'alcool. Les coupes, colorées par le carmin aluné, seront conservées dans la glycérine.

2e *préparation.* — Coupes. Bichromate d'ammoniaque à 2 p. 100 (8 jours). Lavez soigneusement, durcissez par la gomme et l'alcool. Colorez quelques-unes de vos coupes avec l'hématoxyline et l'éosine, conservez-les dans la résine, traitez les autres de la manière suivante : Placez-les dans du *picro-carminate* d'ammoniaque jusqu'à ce qu'elles aient pris une belle teinte rouge (il faut plusieurs heures pour obtenir une coloration suffisante), puis colorez-les avec du *vert de méthyle.* Cette méthode de coloration fournit des différenciations remarquables. Les jeunes cellules sont colorées en bleu; les cellules, qui forment les parois des tubes sont rouges, les spermatozoïdes présentent une belle teinte verte.

3e *préparation.* — Coupes. Alcool absolu (12 heures); durcissez par la gomme et l'alcool; colorez par le picro-carminate et conservez dans la glycérine.

4e *préparation.* — Dissociation. Le sérum iodé faible, le liquide de Muller, l'acide osmique peuvent servir pour dissocier les éléments qui entrent dans la composition des tubes séminifères. L'alcool au tiers rend également de grands services. Faites macérer pendant quelques heures un fragment de testicule dans l'alcool au tiers, grattez légèrement la surface avec un scalpel et délayez le produit du raclage sur une lame dans une goutte du liquide dissociateur. Ajoutez du picro-carminate et couvrez d'une lamelle. Si vous désirez conserver la préparation faites passer de la glycérine sous la lamelle en procédant avec une lenteur extrême.

§ 2. — CONDUITS EXCRÉTEURS

Les conduits excréteurs du sperme (épididyme, canal déférent, vésicules séminales) seront étudiés sur des coupes perpendiculaires à la surface. Nous conseillons de faire deux séries de préparations :

a. Les unes après fixation par le *bichromate d'ammoniaque.* Colorer avec l'hématoxyline et l'éosine ; dammar.

b. Les autres, après fixation par l'*alcool.* Colorer avec le picro-carminate d'ammoniaque. Glycérine.

§ 3. — SPERME

Il est bon d'examiner non seulement le sperme provenant de l'éjaculation mais encore les spermatozoïdes pris directement dans le testicule.

1re *préparation.* — Sperme éjaculé vivant. Placez une goutte de sperme, aussi petite que possible, sur une lame de verre et couvrez d'une lamelle. Mettez une bordure de paraffine pour éviter l'évaporation. Examinez avec un fort grossissement. En faisant passer de l'eau, des acides dilués, etc., sous le couvre-objet, vous observerez l'action nuisible que ces agents exercent sur les spermatozoïdes.

5e *préparation.* — Spermatozoïdes. Dilacérez un fragment de testicule frais dans une goutte de sérum artificiel ou d'humeur aqueuse quand il s'agit du testicule de la grenouille. Couvrez d'une lamelle. Il est bon de répéter cette expérience sur les testicules de différents

animaux, afin de bien se rendre compte de la diversité de forme des spermatozoïdes.

3e *préparation*. — Spermatozoïdes, préparations permanentes : nous donnerons deux méthodes qui permettent d'obtenir des préparations persistantes de spermatozoïdes.

a. Faites passer, sous la lamelle, une goutte de sérum iodé fort. Les spermatozoïdes seront immédiatement tués et prendront une teinte brune qui permettra de bien voir le filament caudal, parfois difficile à distinguer à cause de sa ténuité extrême. Si vous désirez conserver la préparation, faites passer, sous la lamelle, une goutte de carmin boracique, que vous laisserez agir pendant 2 heures ; remplacez ce colorant par un liquide conservateur. Nous conseillons d'employer le liquide de Ripart et Petit dont voici la formule :

Eau camphrée (non saturée)............	75 gr.
Eau distillée............	75 gr.
Acide acétique cristallisé..........	1 gr.
Acétate de cuivre..............	0 gr. 30
Chlorure de cuivre.....................	0 gr. 30

Comme ce liquide s'évapore facilement il est indispensable de luter la préparation avec un soin extrême.

b. Après avoir dissocié, sur une lame, un fragment de testicule, exposez la préparation aux vapeurs d'acide osmique (5 minutes) colorez avec la solution de vert de méthyle à 1 p. 100 et conservez dans une goutte du liquide de Ripart et Petit additionné d'une petite quantité de la solution colorante.

c. Si vous voulez conserver les spermatozoïdes non colorés et cependant bien visibles, faites tomber quelques gouttes de sperme frais dans une petite quantité de la solution suivante :

Bichlorure de mercure.......	1
Chlorure de sodium	4
Eau distillée......	100

Laissez déposer, décantez au bout de 24 heures. Renouvelez la solution, placez une goutte du dépôt sur une lame, couvrez d'une lamelle et lutez *soigneusement*.

4e *préparation*. — Cristaux du sperme. Abandonnez du sperme dans un petit tube pendant 24 heures ou davantage. Examinez une

goutte du dépôt ; sans autre artifice de préparation, vous apercevrez un certain nombre de cristaux prismatiques groupés en croix, ou formant des masses étoilées extrêmement élégantes.

5e *préparation.* — Examen d'une tache de sperme. Avant de rechercher les spermatozoïdes dans une tache douteuse, il est bon d'examiner une tache dont la nature spermatique soit certaine. Placez sur un linge une goutte de sperme et laissez-la sécher. Au bout de 24 heures, quand la dessiccation est complète, « taillez dans le linge taché une bandelette large de 1 centimètre environ et faites la plonger dans un verre de montre rempli d'eau. Faites en sorte que la bandelette plonge dans l'eau jusqu'au voisinage de la tache, celle-ci ne trempant pas dans le liquide. Bientôt la tache imbibée par l'eau qui monte par capillarité, se gonfle et prend l'aspect qu'elle avait à l'état frais. Dès lors, raclez-la avec un scalpel, puis portez la matière, ainsi enlevée, sur le porte-objet du microscope. La préparation renferme des filaments de lin, de chanvre, de coton, de laine ou de soie provenant de l'étoffe ; des poussières diverses, des cellules épithéliales provenant de l'urèthre ou du vagin ; des leucocytes sphériques ou granuleux ; parfois des sympexions, souvent des cristaux, enfin des *spermatozoïdes*. Ceux-ci sont intacts ou brisés, mais presque toujours aisément reconnaissables. Pour mieux les voir il peut être avantageux d'ajouter une goutte d'acide acétique à la préparation ou de les colorer par l'addition d'une petite quantité de la solution d'iode iodurée. (Briand et Chaudé.)

§ 4. — PROSTATE

On étudiera la prostate de l'homme sur des coupes perpendiculaires à la première portion de l'urèthre. Il est bon d'examiner cette glande chez les jeunes sujets et chez le vieillard.

1re *préparation.* — Coupes. Un morceau de prostate dont la direction a été soigneusement déterminée est placé dans l'alcool à 95° (24 heures). Durcir par la gomme et l'alcool. Colorer les coupes par le picro-carminate et monter dans la glycérine.

2e *préparation.* — Coupes. Un autre fragment de la glande est placé dans le bichromate d'ammoniaque à 2 p. 100 (8 jours). Laver

soigneusement ; durcir par la gomme et l'alcool ; colorer par l'éosine et l'hématoxyline ; conserver dans la résine dammar.

3e *préparation.* — Concrétions prostatiques. Ouvrez l'urèthre d'un homme adulte au niveau de la prostate et comprimez cette glande avec vos doigts. Vous verrez suinter un liquide blanchâtre, lactescent qui renferme des granules brunâtres. Portez une goutte de ce liquide sur le porte-objet et couvrez d'une lamelle après avoir ajouté une goutte d'eau. Examinez, d'abord, avec un grossissement faible les grosses concrétions, prenez ensuite un objectif puissant pour étudier les plus petites. Comprimez la lamelle avec une aiguille pour voir leur fractionnement en couches stratifiées. Faites passer, sous la lamelle, une goutte de la solution d'*iode iodurée*, les concrétions prennent une teinte jaune verdâtre qui passe au bleu si l'on ajoute de l'*acide sulfurique* étendu d'eau.

Les *glandes de Cowper*, la *muqueuse* de l'*urèthre* et du *gland*, le *prépuce*, seront étudiés sur des coupes pratiquées après fixation par l'alcool. Les coupes seront colorées par le picro-carminate et conservées dans la glycérine. Nous ne saurions trop conseiller de monter quelques-unes des coupes de la muqueuse uréthrale, vivement colorées par le picro-carminate, dans le mélange de glycérine, d'acide picrique et d'acide formique.

Glycérine	50
Solution saturée d'acide picrique	50
Acide formique	1

Ces préparations montreront le réseau élastique de la muqueuse avec une netteté remarquable.

On fera les observations suivantes sur le tissu érectile des corps caverneux et du corps spongieux de l'urèthre.

1re *préparation.* — Coupes. Un fragment de l'organe érectile est abandonné pendant 8 jours dans une solution de bichromate d'ammoniaque à 2 p. 100. Après les lavages et le durcissement habituel par la gomme et l'alcool, colorez les coupes par l'hématoxyline et l'éosine.

2e *préparation.* — Fibres lisses. Pour mettre en évidence les nombreuses fibres lisses qui entrent dans la composition du tissu érectile, employez l'alcool et la gomme. Colorez fortement les coupes par le picro-carminate et montez-les dans la glycérine formique.

3e *préparation.* — Cellules endothéliales. Piquez avec une aiguille

de Pravaz le corps caverneux d'un animal qui vient de mourir et injectez une certaine quantité de la masse suivante :

Eau distillée	35 gr.
Gélatine	5 gr.
Solution de nitrate d'argent au 100°.	10 gr.

Dissoudre la gélatine dans l'eau et ajouter le nitrate d'argent.

Faites des coupes sur l'organe ainsi injecté après durcissement par la gomme et l'alcool. Exposez la préparation à la lumière et montez dans la résine dammar.

CHAPITRE QUATORZIÈME

APPAREIL GÉNITAL FEMELLE

§ 1. — OVAIRE

Quand on peut se procurer, dans les services de chirurgie, des ovaires à peu près sains, c'est à l'ovaire de femme qu'il faut s'adresser pour faire l'étude de cet organe. Mais, si l'on ne dispose pas de ce matériel, il ne faut pas perdre du temps à le chercher, car les ovaires des animaux donnent des préparations aussi belles et aussi démonstratives. On trouve, dans tous les abattoirs, des ovaires de *vache* et de *brebis* et il est extrêmement facile d'enlever ces organes à une *souris* ou à un *cobaye*. Les ovaires de ces deux derniers animaux sont à recommander parce que leur petit volume permet de les fixer en entier sans leur faire subir trop de compression. Sacrifiez une souris, ouvrez l'abdomen et cherchez l'utérus. Vous trouverez les ovaires aux deux extrémités de ses cornes sous forme de deux organes ovoïdes présentant une coloration jaunâtre.

1re *préparation.* — Ovules. Placez un de ces ovaires sur une lame dans une goutte de la solution physiologique de sel ou de sérum artificiel de Krœneker. Dissociez avec les aiguilles les follicules de de Graaf qui apparaissent à la surface de l'ovaire comme autant de vésicules transparentes, hyalines. Quand cette opération est terminée, cherchez à l'aide d'un grossissement faible, s'il se trouve des ovules isolés et couvrez d'une lamelle.

2e *préparation.* — Fixation et coloration des ovules. Si votre recherche est couronnée de succès examinez soigneusement vos ovules vivants avant de les monter en préparation persistante. Rien de plus simple que d'obtenir cette dernière : Exposez la préparation

à l'action des vapeurs d'acide osmique (3 minutes) colorez par le picro-carminate et conservez dans la glycérine.

3e *préparation.* — Coupes d'ovaire. Placez un ovaire de souris dans l'alcool fort (24 heures). Durcissez par la gomme et l'alcool. Ayez soin d'orienter votre rasoir de telle sorte que vos coupes soient parallèles au grand axe de l'organe et passent par le hile. Colorez avec du picro-carminate et conservez dans la glycérine.

4e *préparation.* — Coupes. Traitez de la façon suivante, un ovaire enlevé au même animal : Liquide de Kleinemberg (24 heures). Alcool à 95° (12 heures), carmin boracique (24 heures), alcool absolu (24 heures), alcool et éther parties égales (24 heures), celluloïdine claire (12 heures), celluloïdine épaisse (24 heures), alcool à 90° (24 heures). Coupez au microtome en mouillant abondamment votre rasoir avec de l'alcool. Montez vos coupes dans le dammar après les avoir éclaircies par l'essence de bergamote. Il faut éviter de se servir d'essence de girofle qui dissout la celluloïdine.

5e *préparation.* — Coupes. Placez un ovaire dans 100 c. c. de bichromate d'ammoniaque à 2 p. 100 (8 jours). Lavez soigneusement, durcissez par la gomme et l'alcool, colorez vos coupes par l'hématoxyline et l'éosine. Résine dammar.

6e *préparation.* — Vaisseaux. Injectez le système artériel d'une souris avec une masse de gélatine au bleu de Prusse. Traitez un des ovaires comme il a été dit pour la 5e préparation.

§ 2. — TROMPES

Rien de plus facile que l'examen de la trompe de Fallope. Traitez un segment du conduit, long de 1/2 centimètre, par l'alcool fort (24 heures), la gomme (12 à 24 heures), l'alcool à 95° (24 heures). Faites des coupes transversales. Picro-carminate d'ammoniaque. Glycérine.

§ 3. — UTÉRUS

L'utérus présente à étudier une tunique musculaire et une muqueuse. C'est l'utérus de l'homme, enlevé dans une opération, qui constitue le meilleur objet d'étude ; mais, comme il est souvent difficile

de s'en procurer un, il faut le remplacer par l'utérus d'un petit animal.

1re *préparation.* — Fibres lisses. Enlevez avec des ciseaux courbes, une petite tranche du muscle utérin et placez-la sur une lame dans une goutte de potasse à 40 p. 100. Couvrez d'une lamelle et dissociez en appuyant votre aiguille sur le couvre objet. Vous obtiendrez ainsi de fort belles cellules entièrement isolées. Il est nécessaire d'examiner immédiatement la préparation qui ne se conserve pas.

2e *préparation.* — Fibres lisses. Faites macérer un morceau de muscle utérin dans la solution suivante :

Acide azotique ordinaire......................	1
Eau distillée..........................	10

Au bout de 24 heures lavez votre pièce dans l'eau distillée et dissociez sur le porte-objet avec les aiguilles. Picro-carmin ; glycérine.

3e *préparation.* — Coupes. Pour voir la disposition des fibres lisses, faites des coupes longitudinales ou transversales en employant la méthode suivante : Fixez par le liquide de *Kleinemberg* (24 heures). Lavez dans l'alcool et, quand toute trace d'acide a disparu, durcissez par la gomme et l'alcool. Picro-carmin, glycérine acide.

4e *préparation.* — Muqueuse. Faites des coupes de la muqueuse *du col* et du *corps* après l'action de l'alcool, de la gomme et de l'alcool. Picro-carmin, glycérine rouge.

§ 4. — ORGANES ACCESSOIRES

La muqueuse du *vagin* sera étudiée sur des coupes pratiquées après fixation par l'alcool. (Picro-carmin, glycérine.) On appliquera la même méthode à l'examen de la muqueuse *vulvaire*, de l'*hymen* des *glandes vulvo-vaginales.*

§ 5. — GLANDE MAMMAIRE

Il est indispensable d'étudier la glande mammaire chez un jeune sujet, chez l'adulte et chez la femelle à l'état de lactation. On prendra de préférence cet organe chez le chat ou le lapin, car il est difficile de se procurer une mamelle de femme suffisamment fraîche.

1re *préparation.* — Placez un morceau de mamelle, mesurant au plus 1 millim. de côté, dans quelques centimètres cubes d'acide osmique au centième (24 heures). Lavez soigneusement et durcissez par la gomme et l'alcool. Les coupes seront colorées avec le carmin de Grenacher et conservées dans la glycérine.

2e *préparation.* — Faites des coupes après fixation par l'alcool et traitez-les par le picro-carminate d'ammoniaque. Glycérine.

3e *préparation.* — Cette troisième série de coupes sera pratiquée sur des morceaux de glande mammaire traités de la manière suivante. Bichromate d'ammoniaque (10 jours). Gomme, alcool. Coupes. Eosine et hématoxyline. Dammar.

4e *préparation.* — Placez un fragment de glande mammaire dans le mélange chromo-platinique de Merkel dont voici la formule :

Sol. acide chromique à 1 p. 100...........	1 vol.
Sol. chlorure de platine..................	1 vol.
Eau.....................	6 vol.

Après 24 à 48 heures de séjour dans cette solution lavez dans l'alcool à 70°. Colorez vos coupes avec le mélange de carmin boracique et de carmin d'indigo.

Préparez la teinture de la manière suivante :

Pesez : Carmin........................	2 gr.
Borax...	8 gr.
Eau distillée...	128 gr.

Faites bouillir. Laissez reposer et filtrez. Conservez dans un flacon bouché.

Préparez d'autre part la solution suivante :

Carmin d'indigo..........................	8 gr.
Borax....................................	8 gr.
Eau distillée.	128 gr.

Filtrez et conservez dans un flacon bien bouché.

Au moment de teindre vos coupes mélangez 1 vol. de la première solution avec 1 vol. de la 2e. Laissez vos coupes dans ce mélange pen- 20 ou 25 minutes puis passez-les quelques secondes dans une solution aqueuse saturée d'acide oxalique. Puis lavez longuement dans l'eau. Alcool à 90° ; alcool absolu ; éclaircissez par la *benzine* employée à la place d'une essence ; dammar.

5[e] *préparation*, — Voici deux méthodes employées par Nissen dans ses recherches sur la glande mammaire (1).

a. Placez un très petit morceau de glande mammaire dans le liquide de Flemming. Au bout de 24 heures lavez soigneusement la pièce durant deux ou trois jours à l'eau courante. Faites une *inclusion dans la paraffine*. Traitez vos coupes par la *benzine* pour dissoudre la paraffine puis par l'*alcool absolu*. Colorez-les ensuite par le procédé suivant emprunté à la méthode de Gram.

Faites dissoudre :

Alcool absolu	15 gr.
Violet de gentiane	1 gr.
Huile d'aniline	3 gr.

Ajoutez 100 *c. c. d'eau distillée et filtrez sur du papier mouillé.*

Les coupes séjournent dans cette teinture trois à cinq minutes, on les rince quelques secondes dans l'alcool absolu (ce qui facilite la décoloration) puis on les traite par la solution suivante :

Eau distillée	300
Iodure de potassium	2
Iode	1

Déshydratez par l'alcool absolu. Essence de girofle et résine dammar. On obtient ainsi une coloration nucléaire parfaitement pure.

b. Un autre petit fragment de glande mammaire est abandonné pendant 12 heures dans une solution aqueuse saturée de bichlorure de mercure. Lavez dans l'eau (24 heures) puis dans l'alcool. Colorez en masse pendant vingt-quatre heures au moins dans une solution aqueuse d'hématoxyline à 1 p. 100. Portez votre pièce dans une solution d'alun à 1 p. 100 où vous la laisserez vingt-quatre heures. Cette solution doit être fréquemment renouvelée et le lavage doit être continué jusqu'à ce que la solution ne se teinte plus ; faites une *inclusion dans la paraffine*. Coupes ; dammar.

(1) Nous empruntons cette technique à l'excellent traité de MM. Bolles Lee et Henneguy que nous avons déjà cité.

CHAPITRE QUINZIÈME

EXERCICES D'EMBRYOGÉNIE

§ 1. — OBJET D'ÉTUDE. COUVEUSES

Il est si facile de se procurer des œufs d'oiseaux et de les soumettre à l'incubation naturelle ou artificielle que nous conseillons de commencer cette étude par l'embryogénie des *oiseaux*. Plus tard, quand on aura acquis une expérience suffisante, on pourra aborder l'étude du développement des mammifères, ce sera même un exercice excellent; mais comme notre livre est avant tout un manuel pour les débutants, nous ne sortirons pas des méthodes applicables à l'étude du développement des oiseaux.

L'œuf de poule est le matériel qui sert le plus ordinairement dans ces recherches. Il faut qu'il soit aussi *frais* que *possible* et qu'il ait été *fécondé*. Tous les nourrisseurs vendent des œufs réalisant ces conditions, et destinés à l'incubation. « La meilleure de toutes les couveuses est la couveuse naturelle, la poule : le nombre des œufs qui ne parviennent pas à se développer est bien moindre qu'avec les couveuses artificielles et la marche du développement est beaucoup plus régulière. Sous la poule, un œuf de 36 heures par exemple se trouvera précisément à la période de développement indiquée dans les traités théoriques. Au contraire dans la couveuse artificielle il est presque certain qu'il n'en est pas ainsi. Une bonne couveuse ne cesse pas de couver pendant trente et quelques jours. Il faut veiller à ce qu'elle ne manque pas d'eau et d'aliments. Il faut mettre les aliments à quelque distance des œufs et faire couver la poule dans un endroit, chaud tranquille et un peu sombre. On inscrira sur la coquille la date du jour où a commencé l'incubation (1). S'il est facile de se procurer

(1) BALFOUR. Embryogénie.

une poule couveuse et un local convenable quand on habite la campagne, il est plus commode dans bien des circonstances, de faire couver les œufs dans des appareils spéciaux à température constante dont on trouve de nombreux modèles, mais à des prix relativement élevés. (étuves; couveuses artificielles, etc.). Celui qui dispose d'un budget modeste pourra se faire construire par un plombier quelconque une étuve à eau semblable à celle que l'on emploie dans les laboratoires de chimie. Cet appareil se compose essentiellement d'une caisse à doubles parois portant deux tubulures à sa face supérieure. L'une de ces tubulures faisant communiquer l'intérieur de l'étuve avec l'air extérieur portera un thermomètre; l'autre conduira dans l'espace compris entre les deux parois. Quand on veut se servir de l'appareil, on verse de l'eau chaude par cette tubulure de façon à remplir l'espace intermédiaire et on attend que la température se soit abaissée à 40°, avant d'y introduire les œufs. « Il est indispensable que la température soit maintenue entre 37° et 40° C. ; elle peut s'élever temporairement de quelques degrés au-dessus de 40°, mais on ne doit pas la laisser tomber au-dessous de 37°. » Il est facile de maintenir une température constante à l'aide d'une veilleuse placée à une distance convenable au-dessous de l'étuve surtout si on a la précaution d'entourer l'appareil d'une couche de ouate ou de feutre. Les œufs seront déposés sur une couche de coton, et retournés au moins une fois par jour. Si on voulait conduire le développement assez loin, il serait bon de placer, dans la couveuse, un cristallisoir rempli d'eau de façon à maintenir une atmosphère humide et de retirer les œufs une fois par jour afin de les laisser refroidir pendant quelques instants.

Les œufs d'*oiseaux très petits* (hirondelles, serins, moineaux, etc.) fourniront des embryons très petits sur lesquels on pourra observer des détails très intéressants. Si nous ajoutons qu'il est très facile de se procurer ces embryons en faisant couver chez soi des oiseaux en captivité (des serins par exemple) et que l'incubation est presque toujours fertile, nous croyons que l'étudiant emploiera souvent ce matériel.

§ 2. — EXAMEN DE L'EMBRYON VIVANT

On prend un œuf de 36 à 48 heures qu'on place, encore chaud, dans un cristallisoir assez grand pour qu'on puisse le recouvrir de

liquide. Il est bon de déposer au fond de ce vase un fragment de gutta percha, sur lequel on applique l'œuf de façon à le fixer solidement. Puis on remplit le cristallisoir avec la solution physiologique de sel chauffée à 39°.

Eau	1000
Chlorure de sodium	6 gr. 5

D'un coup sec on eassse la coquille au niveau de sa grosse extrémité et on agrandit l'ouverture vers la partie supérieure de l'œuf à l'aide d'une pince. On enlève ensuite la membrane coquillère qu'on a eu la précaution de conserver, et on voit apparaître le blastoderme. Quelle que soit la position de l'œuf, l'embryon se trouve toujours, à la partie supérieure. Cette préparation permet d'observer, à la loupe, le blastoderme in situ et vivant. Si l'on a soin de maintenir la température à 38°, l'observation peut être prolongée assez longtemps.

Pour examiner l'embryon, vivant, par transparence, au microscope ou à la loupe, il convient d'employer la méthode suivante indiquée par le professeur Duval. L'aire embryonnaire ayant été mise à découvert on enlève l'œuf du cristallisoir, et on applique à la surface du vitellus un *anneau* de papier gommé entourant l'air embryonnaire. Lorsque le papier adhère à la membrane vitelline, ce qui arrive au bout de quelques minutes, on plonge l'une des lames d'une paire de ciseaux pointus et fins immédiatement en dehors du bord externe de l'anneau de papier, et on incise circulairement. On plonge de nouveau l'œuf dans la solution physiologique de sel en évitant autant que possible d'agiter le liquide. Le blastoderme se détache en même temps que la membrane vitelline et l'anneau de papier, il est facile de l'étaler sur une lame ou sur un verre de montre plongé dans le cristallisoir.

§ 3. — FIXATION DU BLASTODERME

On peut employer un grand nombre de réactifs pour fixer le blastoderme et les embryons de poulet, mais c'est l'*acide osmique* et la *liqueur de Kleinemberg* qui fournissent les résultats les plus beaux et les plus constants.

1° L'*acide osmique* à 1 p. 100 convient tout spécialement pour fixer les embryons pris dans le courant des trois ou quatre premiers jours de l'incubation. L'œuf étant ouvert à sa partie supérieure, on laisse échapper la plus grande partie de l'albumen, puis on verse sur l'aire embryonnaire quelques gouttes du fixateur. Au bout d'une ou deux minutes, quand le blastoderme commence à noircir, on porte l'œuf dans un cristallisoir plein d'eau et, avec des ciseaux fins, on découpe circulairement l'embryon. Cette opération est extrêmement simple parce que la plaque embryonnaire est devenue ferme et résistante sous l'influence du fixateur. S'il s'agit d'un embryon très petit, l'action de l'acide osmique, agissant pendant une minute, suffit pour produire une bonne fixation; mais si l'on opère sur un embryon plus volumineux (5 ou 6 jours par exemple) il est bon, après l'avoir traité comme il vient d'être dit, de le mettre pendant 10 ou 15 minutes dans une petite quantité de la solution fixatrice, après quoi on lave pendant une demi-heure ou une heure, puis on termine par la série des opérations qui seront indiquées plus loin.

2° Le *liquide de Kleinemberg* est un fixateur très fidèle qu'on emploie journellement dans les recherches embryogéniques. Voici sa formule légèrement modifiée par Bolles Lee et Henneguy.

On mélange :

Eau distillée	100
Acide sulfurique pur et concentré	2

Et on ajoute de l'acide picrique autant qu'il s'en dissoudra. Filtrer et ajouter 3 *volumes d'eau.*

On laisse les embryons dans ce liquide quatre heures ou même davantage si le développement est très avancé. On les porte ensuite dans l'alcool à 70° que l'on renouvelle jusqu'à disparition de toute trace d'acide. Il faut éviter de laver, dans l'eau, les pièces fixées par ce liquide.

§ 4. — COLORATION

Les embryons, fixés par l'une des méthodes précédentes, seront colorés en masse. Après l'acide osmique on emploiera le *carmin aluné de Grenacher* (12 heures). Après le liquide de Kleinemberg

on colorera, au sortir de l'alcool qui a servi à enlever l'aeide picrique, avec le *carmin boracique alcoolique*. La durée du séjour dans la solution colorante varie, suivant la grosseur de l'embryon, de 12 à 24 heures. Il est bon de laver l'embryon, fortement coloré, dans l'*eau* (après le carmin à l'alun) ou dans l'*alcool* acidulé (après le earmin boraeique) jusqu'à disparition de l'exeès de matière colorante.

§ 4. — EXAMEN DE L'EMBRYON ENTIER

La plaque embryonnaire, ainsi fixée et eolorée, constitue dans les premières heures du développement (18 à 48 heures) une exeellente préparation pour l'étude des formes extérieures de l'embryon. La meilleure méthode eonsiste à l'étaler sur un porte-objet et à la traiter par l'alcool a 90° puis par l'alcool absolu. On remplace ce dernier par de l'essence de bergamote puis on monte dans la résine dammar. Il est bon de soutenir la lamelle par une petite eale en papier pour éviter de déformer les plissements qui eirconscrivent la ligne primitive et le eapuchon céphalique.

§ 5. — INCLUSION. COUPES EN SÉRIE

Les embryons, destinés à être débités en eoupes (il est absolument néeessaire d'avoir des eoupes longitudinales et transversales d'embryons pris à différentes périodes de l'incubation), seront inclus dans la eelluloïdine et dans la paraffine combinées. Voici d'ailleurs la marche qu'il faudra suivre dans ces opérations.

1. — Alcool à 90°; aleool absolu ; alcool absolu et éther parties égales. Celluloïdine.

2. — Durcissement par le ehloroforme. Inclusion à la paraffine en opérant dans le vide (1).

Le bloe de paraffine, eontenant l'embryon, étant minutieusement orienté sur le porte-objet du microtome à baseule on fera exécuter à eet instrument un mouvement rapide de façon à obtenir un ruban de eoupes. Ce ruban sera divisé en segments d'une longueur un peu infé-

(1) Voyez page 127.

rieure à celle des lamelles dont on dispose en ayant soin de les placer sur des carrés de papier portant un numéro d'ordre et conservés à l'abri des courants d'air. Quand on aura achevé un embryon on procédera au montage des coupes. C'est une opération extrêmement simple, mais qui nécessite la *fixation* des coupes sur le porte-objet. Bien qu'il existe un grand nombre de procédés permettant d'arriver à ce résultat, nous nous contenterons d'écrire la méthode de Schällibaum qui nous a toujours fourni d'excellentes préparations. Voici comment il convient de procéder. On mêle ensemble 1 partie de collo-

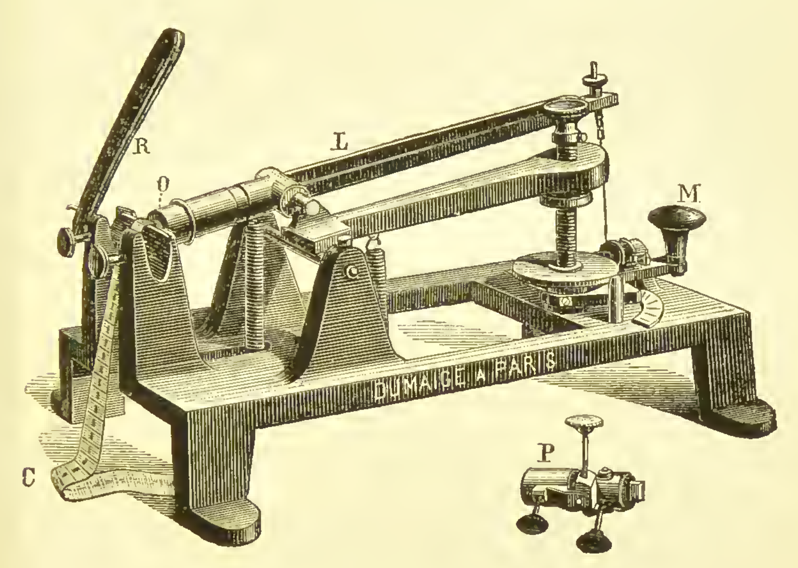


Fig. 21. — Microtome pour faire les coupes en série.

dion et selon la consistance 3 ou 4 parties d'essence de girofle. A l'aide d'un pinceau on étale sur un porte-objet une couche *aussi mince* que possible de la solution obtenue. On range les coupes sur la couche collante en les applatissant légèrement avec un pinceau, puis on chauffe *doucement* le porte-objet pendant quelques minutes de façon à évaporer l'essence. Après cette opération les coupes sont fixées dans leur situation, il ne reste plus qu'à enlever la paraffine avec de la benzine et à couvrir avec une lamelle enduite de résine dammar. Il arrive parfois que la couche de collodion, située entre les coupes, présente une coloration blanche plus ou moins opaque qui gêne l'observation. Cela

provient de ce que l'on a employé une solution trop riche en collodion ou de ce qu'on en a mis une couche trop épaisse. On peut sauver la préparation, déjà montée dans la résine, en *dissolvant* cette dernière par la benzine puis en *déshydratant* par l'alcool absolu et en brossant l'espace opaque avec un pinceau très légèrement imbibé d'essence de girofle (1).

(1) Bolles Lee et Henneguy.

CHAPITRE SEIZIÈME

PEAU

La peau étant une membrane susceptible de se rétracter sous l'influence des réactifs, il est indispensable de la fixer, convenablement étalée et maintenue à l'état d'extension, par les procédés indiqués pour l'étude des objets membraneux. Ce précepte est particulièrement applicable à la fixation d'un morceau de peau par l'*alcool* ou par les *bichromates*. Quand on se sert d'*acide osmique*, le morceau de peau étant très petit et la rapidité du fixateur étant considérable, il n'est pas besoin de remplir cette condition. Nous devons répéter ici ce que nous avons déjà dit bien souvent, à savoir qu'il faut prendre de la peau *extrêmement fraîche* comme celle qu'on peut se procurer à la suite d'une opération. Nous ne saurions trop conseiller d'examiner la peau prise dans différentes régions du corps afin d'observer les modifications que présentent les couches qui la composent.

§ 1. — ÉPIDERME

Pour étudier l'épiderme, prenez la peau de la pulpe du doigt et faites les préparations suivantes.

1re *préparation*. — Coupes. Pour avoir une vue générale des couches de l'épiderme traitez un morceau de peau par l'alcool et la gomme Coupes perpendiculaires à la surface. Picro-carminate, glycérine.

2e *préparation*. — Eléidine. Une des coupes obtenues par la méthode précédente est colorée sur une lame avec la teinture suivante :

Picro-carmin à 1 p. 100................	1 goutte.
Eau distillée..........................	10 gouttes.

Suivez la coloration à l'aide d'un faible grossissement et quand les grains d'éléidine ont pris une teinte rouge couvrez d'une lamelle. Remplacez le picro-carmin (la pénétration doit se faire très lentement dans la chambre humide) par une goutte de glycérine neutre ou mieux de glycérine légèrement teinte en jaune par de l'acide picrique. Cette préparation se conserve très bien. Traitez une seconde coupe, colorée comme nous venons de le dire, par la *glycérine acétifiée* vous verrez disparaître les grains d'éléidine.

3e *préparation.* — Acide osmique. Placez un morceau de peau de 1 millim. de côté et bien débarrassé du tissu sous-cutané, dans quelques centimètres cubes d'acide osmique à 1 0/0. Après 24 heures de séjour dans cette solution lavez soigneusement dans l'eau filtrée (12 heures) et durcissez par la gomme et l'alcool. Les coupes, perpendiculaires à la surface, colorées ou non par le carmin aluné, laisseront voir les différentes couches de l'épiderme avec une netteté remarquable.

4e *préparation.* — Bichromate. Un fragment de peau est abandonné pendant un mois ou même d'avantage dans une grande quantité de bichromate d'ammoniaque à 2 p. 0/0 (il faut 200 centimètres cubes de solution pour 1 centimètre carré de peau). Au bout de ce temps lavez la pièce à grande eau pendant 24 heures puis durcissez par la gomme et l'alcool. Faites des coupes *très minces* normales à la surface et montez-les dans l'eau phéniquée. C'est le meilleur procédé pour voir les filaments d'union des cellules du corps muqueux de Malpighi.

5e *préparation.* — Hématoxyline et éosine. Une des coupes, obtenues dans la 1re préparation, est colorée par l'*hématoxyline* de Ranvier puis par l'éosine. Alcool, alcool absolu, essence de bergamote, dammar.

6e *préparation.* — Un morceau de peau, fixé par le bichromate d'ammoniaque comme il a été dit plus haut, est coloré en masse par un séjour de 24 heures dans le carmin aluné. Faites une *inclusion dans la paraffine* et orientez votre peau dans un microtome de façon à obtenir des coupes *parallèles* à la surface. Montez dans le dammar en suivant les règles qui ont été données pour l'examen des coupes pratiquées après inclusion dans la paraffine.

7e *préparation.* — Dissociation. Le meilleur procédé consiste à faire macérer un morceau de peau, mesurant 1 ou 2 millim. de côté,

dans le *sérum iodé*. « Comme la macération doit être prolongée pendant trois ou quatre semaines, il faut avoir soin d'ajouter quelques gouttes de sérum fortement iodé à mesure que la solution se décolore. Au bout de ce temps placez le fragment de peau sur une lame de verre, et à l'aide d'un scalpel à trempe dure, faites des coupes perpendiculaires à la surface. Il suffit alors d'agir avec les aiguilles pour séparer le revêtement épidermique du corps papillaire sous-jacent. Dans cette opération un certain nombre de cellules sont mises en liberté. Picro-carmin, glycérine. (Ranvier. Traité technique d'histologie.)

8e *préparation*. — Union de l'épiderme et du derme. Prenez un lambeau de la peau dans une région où la couche épidermique est mince, et faites-le macérer dans la solution suivante :

Eau....................................	150 gr.
Acide acétique..........................	1 gr.

Au bout de 24 à 48 heures, saisissez, avec une pince, l'un des bords de la couche épidermique, et tirez doucement; vous obtiendrez ainsi des plaques épidermiques, que vous examinerez par leur face profonde.

§ 2. — DERME

Aux procédés précédents (1, 3, 5, 6) qui peuvent servir pour l'étude de cette couche de la peau, il faut ajouter quelques préparations spéciales.

1re *préparation*. — Fibres élastiques. Une des coupes obtenues après l'action de l'alcool (*épiderme* 1re *préparation*) est fortement colorée par le picro-carminate, lavée, puis montée dans le mélange de glycérine, d'acide picrique et d'acide formique.

2e *préparation*. — Fibres élastiques. Colorez fortement avec l'éosine une coupe de peau pratiquée après fixation par l'alcool et montez-la dans une goutte de potasse à 40 p. 100.

3e *préparation*. — Faites des coupes sur de la peau traitée comme il a été dit pour la première préparation. Placez les coupes pendant 24 heures dans la teinture suivante :

Dahlia..................................	0 gr. 2
Alcool..................................	5 gr.
Eau distillée...........................	5 gr.

Faites dissoudre et ajoutez :

Acide azotique........	2 gr.
Eau..........	18 gr.
Alcool................	10 gr.

Après coloration traitez par l'acide acétique et montez dans la résine ou dans la glycérine. Dans ce dernier cas, la préparation ne se garde pas (1).

4e *préparation.* — Cellules du derme. Traitez une coupe de la peau par le procédé employé par Erlich pour l'examen des cellules à granulations.

5e *préparation.* — Cellules. Un fragment de peau mesurant un ou deux millimètres de côté, est placé dans du jus de citron fraîchement exprimé et filtré sur de la flanelle. Au bout de dix minutes on le lave rapidement et on le porte dans quelques centimètres cubes de chlorure d'or. Laver de nouveau et réduire dans l'acide formique au quart (24 heures). Durcir par la gomme et l'alcool, et monter les coupes dans la glycérine. (Ranvier. Traité technique.)

6e *préparation.* — Vaisseaux sanguins. Injectez un doigt de l'homme en suivant la technique indiquée dans le chapitre réservé aux méthodes d'injection. Traitez un fragment de peau de la pulpe du doigt par le bichromate, la gomme et l'alcool. Coupes perpendiculaires à la surface. Coloration par le carmin aluné. Résine dammar.

7e *préparation.* — Vaisseaux lymphatiques. Pour injecter les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques, il faut employer le procédé suivant, indiqué par le professeur Ranvier. Remplissez de bleu soluble une seringue hypodermique, munie d'une canule à pointe fine, à biseau très court. Piquez obliquement la peau tout en poussant le piston. S'il se forme une élevure, l'injection est à recommencer, s'il se produit une tache à diffusion rapide, la préparation est réussie. Dans ce cas injectez les vaisseaux sanguins avec une masse de gélatine au carmin, et puis prenez de la peau dans les points réussis que vous durcirez par le bichromate. Alcool et gomme. Coupes perpendiculaires à la surface. Résine dammar.

(1) Procédé attribué à Unna par Bolles Lee et Henneguy.

§ 3. — GLANDES SUDORIPARES

Pour étudier les glandes sudoripares prenez de la peau aussi fraîche que possible dans les régions où ces glandes abondent (doigts, aisselle, etc.). La plupart des réactifs que nous avons employés pour l'étude de l'épiderme, peuvent servir pour fixer les glandes sudoripares. Nous conseillons d'employer l'*alcool*, le *bichromate*, l'acide *osmique* en observant les règles particulières à chacun de ces fixateurs. On fera des coupes normales à la surface : les unes un peu épaisses pour voir l'ensemble du tube sudoripare; les autres *extrêmement minces* pour étudier les détails. On emploiera comme colorant : le picro-carminate, le carmin aluné, l'hématoxyline et l'éosine.

§ 4. — GLANDES SÉBACÉES

Nous conseillons de faire les préparations suivantes pour étudier la structure des glandes sébacées.

1re *préparation.* — Prenez un fragment de peau des bourses et traitez-le par la solution de bichromate à 2 p. 100 (10 jours). Durcissez par la *gomme* et l'*alcool*. Colorez quelques-unes de vos coupes avec l'hématoxyline et l'éosine, conservez-les dans le dammar. Placez les autres dans un petit tube contenant du picro-carminate d'ammoniaque. Quand la coloration est suffisante, ce qui arrive au bout de 24 heures, lavez-les dans l'eau, exposez aux vapeurs d'acide osmique. Conservez dans la glycérine.

§ 5. — POILS

1re *préparation.* — Épiderme. Placez un cheveu dans un verre de montre contenant une certaine quantité de la solution de soude ou de potasse caustique à 40 p. 100. Après avoir légèrement élevé la température, grattez la surface avec un scalpel et examinez dans une goutte du réactif employé.

2e *préparation.* — Couche corticale. Placez un poil sur une lame

porte-objet dans une goutte d'acide sulfurique ordinaire. Couvrez d'une lamelle et chauffez doucement sur la flamme de la lampe à alcool. Pour dissocier les cellules de la couche corticale, pressez sur le couvre-objet avec une aiguille.

3e *préparation.* — Moelle. Pour étudier les cellules médullaires prenez des cheveux blancs. Faites-les bouillir dans la solution de soude à 40 p. 100 jusqu'à ce qu'ils se gonflent et se crispent. Couvrez d'une lamelle et examinez avec un grossissement moyen. Si la substance corticale gêne l'observation, dilacérez vos cheveux avec les aiguilles. Vous isolerez sans trop de peine des séries tout entières d'éléments médullaires. (Pouchet et Tourneux.)

4e *préparation.* — Coupes. Pour obtenir des coupes perpendiculaires au grand axe des poils, il faut faire une inclusion double au collodion et à la paraffine. Voici comment nous conseillons de procéder.

a. Prenez une lame porte-objet et placez à une de ses extrémités une goutte de cire à cacheter, saisissez ensuite le cheveu dont vous désirez faire la coupe et fixez le sur la cire en le faisant pénétrer au moyen d'une tige de fer ou d'une aiguille qu'on chauffe à la lampe. Agissez de même pour un second, un troisième, un quatrième, etc... cheveu que vous fixerez les uns à côté des autres. Prenez ensuite un morceau de diachylon de la largeur de lame et appliquez-le à son extrémité opposée. L'adhérence a lieu facilement en appuyant avec la pulpe du doigt. Déposez sur le diachylon une goutte de cire à cacheter et reprenant chaque cheveu, un à un, fixez-les avec la tige chauffée par leur autre extrémité de façon à les faire adhérer à la bandelette de diachylon » (1). Traitez les cheveux placés les uns à côté des autres et régulièrement tendus, par l'alcool absolu, puis par l'éther en évitant avec soin de mouiller le diachylon (2). Cela fait, arrosez-les avec du collodion de façon à les englober dans une masse que vous laisserez s'épaissir par évaporation de l'éther.

b. Enlevez la couche de collodion qui renferme les cheveux et durcissez par le chloroforme. Faites ensuite une inclusion dans la paraffine en suivant la méthode ordinaire. Faites des coupes perpendiculaire en vous servant du microtome et montez les dans le dam-

(1) Ce tour de main, ainsi que l'emploi du collodion pour l'étude des poils est dû au Dr Paul Latteux. Technique microscopique.

(2) Si les cheveux se détendent et deviennent flexueux, tendez-les de nouveau en déplaçant le diachylon (Latteux).

mar. Évitez de vous servir d'essence de girofle qui dissoudrait le collodion et remplacez cet éclaircissant par l'essence de bergamote ou par la benzine.

5e *préparation.* — Gaines épithéliales du follicule pileux. Prenez un morceau de cuir chevelu aussi frais que possible et dont vous aurez rasé les poils. Traitez-le par l'alcool (24 heures) la gomme (48 heures) l'alcool (24 heures). Faites deux séries de coupes : les unes, parallèles les autres, normales à la surface. Il faut observer certaines règles pour obtenir de bonnes coupes longitudinales comprenant le poil, les gaines épithéliales et la papille. Les poils n'étant pas implantés verticalement, mais dans une direction plus ou moins oblique, il est nécessaire de trouver la direction suivant laquelle doit être orienté le rasoir, de là nécessité de quelques tâtonnements. Le meilleur moyen d'arriver à un résultat convenable c'est d'exécuter les coupes à *main libre* et de faire un assez grand nombre de sections suivant des incidences variables. Les bonnes coupes seront colorées par le picrocarminate et montées dans la glycérine.

6e *préparation.* — Faites les mêmes préparations avec un morceau de cuir chevelu fixé par le bichromate (8 jours) et durci par la gomme et l'alcool. Colorez avec l'éosine et l'hématoxyline. Résine dammar.

§ 6. — ONGLES

1re *préparation.* — Dissociation. Placez un morceau d'ongle dans une goutte de potasse à 40 p. 100 ou d'acide sulfurique ordinaire et chauffez sur la flamme d'une lampe à alcool. Couvrez d'une lamelle et comprimez légèrement la préparation. Il est nécessaire d'examiner, de temps en temps, la préparation pendant que l'on chauffe sans quoi on s'exposerait à pousser trop loin l'action de la chaleur. Avec la potasse les cellules unguéales se gonflent et laissent voir leur noyau.

2e *préparation.* — Dissociation. Faites macérer un fragment d'ongle dans l'ammoniaque, au bout de 24 heures examinez dans une goutte de ce réactif et comprimez le couvre-objet.

3e *préparation.* — Coupes. Pour être instructives les coupes doivent comprendre, l'ongle, le lit et la matrice, le repli sus-unguéal.

Prenez le doigt d'un sujet jeune enlevé dans une amputation. Avec un scalpel pointu circonscrivez tous les tissus situés au-dessous de l'ongle en rasant soigneusement la phalange. Placez le tout dans l'alcool à 90° (24 heures), puis durcissez par la gomme et l'alcool. Faites des coupes longitudinales et transversales en employant le procédé suivant : calez soigneusement la pièce dans le cylindre du microtome Ranvier en vous servant non pas de moelle de sureau mais de morceaux de liège fin. Fixez le microtome sur un étau puis, avec un rasoir à trempe dure, coupez le liège et l'ongle comme vous feriez pour un tissu ordinaire monté dans la moelle de sureau. Il est nécessaire d'arroser abondamment la pièce avec de l'alcool pendant tout le temps de l'opération. Il ne faut pas chercher à faire des coupes trop fines ; les sections de moyenne épaisseur et complètes conviennent très bien pour l'examen. Colorez vos coupes par le picro-carminate et montez-les dans la glycérine neutre ou acide.

§ 7. — TERMINAISONS NERVEUSES

Nous étudierons successivement la préparation des fibres nerveuses intra-épithéliales, des corpuscules de Meissner et des corpuscules de Pacini.

1re *préparation.* — Fibres intra-épithéliales. Prenez, sur un doigt, parfaitement frais, au niveau de la face palmaire de la 3e phalange, un morceau de peau mesurant un ou deux millimètres de côté. Après avoir enlevé le tissu cellulaire sous-cutané, placez-le dans le mélange de chlorure d'or et d'acide formique.

Chlorure d'or à 1 p. 100....................	4 p.
Acide formique..........................	1 p.

Faites bouillir et laissez refroidir.

Au bout d'une heure de séjour dans ce liquide, placez la pièce dans de l'eau légèrement acétifiée après avoir enlevé l'or en excès en la plongeant très *rapidement* dans l'eau distillée. La réduction doit se faire à la lumière du jour. Quand elle est achevée (ce qui arrive au bout de 36 à 48 heures) on porte la pièce dans l'alcool fort. Coupes perpendiculaires à la surface. Glycérine. (Ranvier. Traité technique.)

2e *préparation.* — Corpuscules de Meissner. On pourra très bien observer les corpuscules de Meissner sur les coupes obtenues dans les préparations de peau faites après l'action de l'*acide osmique* et de l'*alcool* (voir 1re préparation p. 181 et 3e, p. 182) : nous indiquerons en outre les procédés suivants :

Un fragment de peau de la pulpe du doigt est placé pendant quinze minutes daus du jus de citron. Lavez puis portez dans le chlorure d'or ou dans le chlorure double d'or et de potassium (une heure). La réduction s'obtient dans de l'eau légèrement acétifiée à la lumière du jour. Elle s'effectue très lentement (deux ou même plusieurs jours) aussi on a cherché à la rendre plus rapide. « On peut, après avoir laissé séjourner les fragments chlorurés dans l'eau distillée pendant douze à vingt-quatre heures, les chauffer dans l'acide tartrique en solution saturée, à la température de 70° à 80°. Au bout de quelques instants, quinze à vingt minutes au plus, les fragments ont pris une belle teinte variant du rouge vif au violet foncé. En chauffant trop longtemps on obtient un dépôt granuleux et noir qui gêne l'observation. On arrive par des tâtonuements à saisir le moment où il faut cesser de chauffer. » La pièce, dorée par la méthode *lente* (acide acétique et lumière) ou par la méthode *rapide* (acide tartrique et chaleur), est ensuite placée dans l'alcool fort. Si le durcissement n'est pas suffisant on le complète par la gomme et l'alcool et on fait des coupes perpendiculaires à la surface qu'on monte dans la glycérine.

3e *préparation.* — Corpuscules de Pacini. Avant d'étudier les corpuscules de Pacini, que l'on trouve sur le trajet des nerfs collatéraux des doigts, il est bon d'examiner ces corpuscules dans le mésentère du jeune chat.

a. Corpuscules du mésentère du chat. Étalez un lambeau du mésentère du chat pris au niveau du point d'insertion de cette séreuse et cherchez les corpuscules à l'aide d'un faible grossissement. Quand vous en aurez découvert quelques-uns, il faut parfois faire un assez grand nombre de préparations, débarrassez-les, à l'aide des aiguilles du tissu conjonctif et des cellules adipeuses qui les accompagnent et placez-les dans la solution de nitrate d'argent à 1 p. 300. Quand l'imprégnation est produite, lavez dans l'eau distillée et montez dans la glycérine.

b. Corpuscules des nerfs collatéraux. Le professeur Ranvier conseille d'employer le procédé suivant pour découvrir les corpuscules

de Pacini placés sur le trajet des nerfs collatéraux des doigts : « Dans un doigt de l'homme tout à fait frais, provenant d'une amputation par exemple, on pratique, avec une seringue de Pravaz, sur le trajet des nerfs collatéraux, une injection d'acide osmique de 1 p. 100. Puis après avoir incisé la peau suivant le trajet, on saisit un des lambeaux de l'incision et on le dissèque. Au milieu du pannicule adipeux coloré en noir, on distingue les corpuscules de Pacini colorés en jaune clair et translucides. Après les avoir recueillis, on les débarrasse des débris de tissus conjonctif qui y adhèrent et on les plonge dans une solution de picro-carmin à 1 p. 100, où on les laisse pendant 24 heures. On les lave et on complète leur durcissement par l'alcool ». Avec un peu d'habitude on obtient facilement des coupes longitudinales et transversales de corpuscules simplement fixés dans un bâton de moelle de sureau. Il est infiniment plus simple d'*inclure les corpuscules dans de la paraffine* et de faire les coupes au microtome. On suivra la technique suivante : Au sortir de l'alcool à 90° le corpuscule est placé dans l'alcool absolu (12 heures) puis dans l'essence de bois de cèdre (12 heures) et enfin dans les bains de paraffine (voyez page 33). Orientez soigneusement votre corpuscule dans la boîte à inclusion avant de faire vos coupes. Celles-ci, une fois faites, dissolvez la paraffine par la benzine et montez dans la résine dammar.

c. Pour voir le réseau capillaire des corpuscules de Pacini faites des coupes sur des corpuscules pris sur un doigt injecté avec une masse de gélatine au bleu de Prusse.

CHAPITRE DIX-SEPTIÈME

ŒIL

§ 1. — CORNÉE

Pour étudier cette membrane prenez la cornée de la *grenouille*, du *lapin* ou de l'*homme* si vous pouvez en avoir une parfaitement fraîche.

1re *préparation*. — Cellules fixes. Imprégnation d'argent. On peut faire une imprégnation *négative* ou *positive* (1) de la cornée suivant le mode d'emploi du réactif. Pour faire une imprégnation négative promenez un crayon de nitrate d'argent sur la cornée d'une grenouille laissée en place, puis enlevez l'œil pour le placer dans l'eau distillée. Avec des ciseaux fins enlevez la cornée, grattez-la sur ses deux faces pour enlever l'épithélium et montez-la dans la glycérine ou dans la résine dammar.

2e *préparation*. — Imprégnation d'argent. Une cornée de grenouille traitée par la méthode précédente est abandonnée pendant deux ou trois jours dans de l'eau distillée. Au bout de ce temps on la monte dans la résine dammar ou dans la glycérine. Les espaces intercellulaires sont devenus clairs et les cellules ont pris une teinte noire. C'est là une imprégnation *positive* de la cornée.

3e *préparation*. — Imprégnation par l'or. Placez une cornée de grenouille dans du jus de citron ou dans une solution faible d'acide acétique à 1 p. 100 (5 ou 6 minutes). Après l'avoir épongée avec du papier filtre portez-la dans une solution de chlorure d'or à 1 p. 100 où elle doit séjourner sept à huit minutes. Au bout de ce temps, la cornée étant bien imbibée par la solution du sel d'or, transportez cette membrane dans de l'eau acétifiée. En général, la réduction est com-

plète au bout de vingt-quatre heures et la cornée a pris une belle teinte lilas. Grattez l'épithélium et montez la cornée dans la glycérine. Si l'épaisseur de la membrane gêne l'observation, coupez, avec un rasoir bien tranchant des lames parallèles à la surface que vous examinerez comme s'il s'agissait de la cornée entière.

4° *préparation*. — Cellules fixes. Placez une cornée de grenouille sur une lame et exposez-la aux vapeurs d'iode. Quand elle a pris une teinte brune raclez l'épithélium et examinez avec un grossissement moyen. Si la coloration n'est pas suffisante exposez de nouveau à l'action des vapeurs d'iode. Le réseau des cellules fixes est coloré avec une précision remarquable.

5e *préparation*. — Cellules fixes. Pour voir les cellules fixes à l'état vivant, prenez une cornée de grenouille, et montez-la dans la chambre humide porte-objet de Ranvier. Tout d'abord les cellules sont invisibles, mais leur corps apparaît peu à peu, et au bout d'une heure, leur image est nettement dessinée. Enlevez la paraffine qui borde la lamelle, et exposez la cornée à l'air : les cellules deviennent de nouveau entièrement invisibles. Cela tient à des modifications hygroscopiques qui déterminent des changements dans la réfringence des éléments qui forment la cornée. (Ranvier.)

6e *préparation*. — Placez la cornée de l'homme, du lapin, du cobaye, de la grenouille, etc., dans la solution saturée d'acide picrique dans l'eau. Complétez le durcissement par l'action de la gomme et de l'alcool, et faites des coupes perpendiculaires à la surface, passant par un méridien de la membrane. Colorez ces coupes, dégommées, par le *picro-carminate* d'ammoniaque, et montez vos préparatious dans la *glycérine acide*.

7e *préparation*. — Fibres suturales. Pour bieu voir les fibres suturales, faites la préparation précédente avec la cornée d'uu plagiostome, la raie par exemple.

8e *préparation*. — Nerfs. La meilleure méthode pour démontrer les nerfs de la cornée est celle du jus de citron et du *chlorure d'or*. Une cornée, enlevée à une grenouille vivante, est placée dans les liquides suivants :

a. Jus de citron fraîchement exprimé et filtré (5 minutes).

b. Chlorure d'or (40 minutes).

c. Eau acétifiée.

Après un séjour de 24 à 48 heures dans l'eau acétifiée, la cornée est

devenue violette et les nerfs sont convenablement colorés. On grattera l'épithélium et on examinera dans la glycérine.

9e *préparation.* — Nerfs dans l'épithélium. Faites une imprégnation de plusieurs cornées de grenouille, comme il a été dit dans la préparation précédente.

a. Montez une de ces cornées à plat, sans *racler l'épithélium antérieur.*

b. Placez-en une autre dans l'alcool fort. Au bout de 24 heures, faites des coupes perpendiculaires à la surface, et examinez dans la glycérine. Si le durcissement de la membrane n'est pas suffisant pour exécuter les coupes, employez la gomme et l'alcool (1).

§ 2. — IRIS

1re *préparation.* — Muscle. Pour étudier les fibres musculaires de l'iris, prenez un œil de lapin albinos. Divisez-le en deux segments, l'un postérieur, l'autre antérieur, en orientant votre rasoir de telle sorte que ce dernier renferme l'iris en entier. Placez ce segment dans l'alcool au 1/3 (24 heures). Au bout de ce temps, détachez soigneusement l'iris, brossez-le sur ses deux faces avec le pinceau, de façon à détacher l'épithélium, puis colorez-le par le picro-carminate. La préparation doit être examinée dans la glycérine formique.

2e *préparation.* — Nerfs. Traitez l'iris du lapin albinos par la méthode du jus de citron et du chlorure d'or en suivant la technique employée pour la démonstration des nerfs de la cornée.

L'épithélium de l'iris sera étudié sur des coupes de l'œil entier.

§ 3. — CRISTALLIN

Pour dissocier les fibres du cristallin on emploiera la méthode de Max. Schultze : Placer cet organe dans la solution suivante :

Eau distillée...........................	30 gr.
Acide sulfurique........................	4 gouttes (2).

(1) Les noyaux des cellules fixes ne se montrent que lorsque la cornée est morte.
(2) Max. Schultze emploie un acide dont le poids spécifique est de 1,839.

Au bout de 24 heures de macération il suffit d'agiter un fragment de cristallin dans une goutte de ce liquide pour obtenir un grand nombre de fibres parfaitement isolées.

§ 4. — RÉTINE

1re *préparation*. — Coupes de la rétine du Triton crêté. D'après Ranvier il n'y a pas de rétine plus démonstrative que celle du Triton crêté, principalement en ce qui concerne les couches des cellules visuelles. Il faut suivre exactement la technique employée par cet auteur pour l'étude de cette membrane.

a. L'œil entier, suspendu à un bouchon de liège, est exposé aux *vapeurs d'acide osmique*.

b. Au bout de *dix minutes* on porte l'œil dans l'*alcool au tiers* et par une incision circulaire, pratiquée à l'aide des ciseaux fins, on le divise en deux segments. Le segment postérieur renfermant la rétine est abandonné pendant quelques heures dans l'alcool au tiers.

On le porte ensuite dans du *picro-carminate* où il doit séjourner quelques heures.

c. Au sortir de ce bain on le place dans deux ou trois c. c. *d'acide osmique à 1 p. 0/0*. Ce dernier réactif achève de fixer les éléments si altérables de la rétine.

d. Après quoi on le met à dégorger dans l'eau et on le transporte dans l'*alcool fort*. Au bout de vingt-quatre heures le durcissement est suffisant pour qu'on puisse faire des coupes à main libre. Ces coupes sont très belles, mais il faut une grande habileté pour les obtenir assez fines. En employant la méthode d'*inclusion à la paraffine* on tourne la difficulté et on obtient des préparations dont les éléments ne sont pas sensiblement altérés. Ces coupes sont conservées dans la glycérine ou dans la résine dammar.

2e *préparation*. — Dissociation. Placez un œil de Triton crêté dans la solution d'acide osmique à 1 p. 0/0. Au bout de vingt-quatre heures incisez le bulbe au niveau de son équateur et transportez le segment postérieur dans l'eau distillée où vous le ferez macérer pendant deux ou trois jours. Enlevez avec des ciseaux courbes un fragment de la rétine et dissociez sur une lame avec les aiguilles. Picrocarminate et glycérine. (Ranvier.) On peut employer, au lieu d'eau

pure : l'*alcool au tiers*, le *sérum iodé*, l'*acide chromique*, très faible, pour faire macérer la rétine fixée par l'osmium.

§ 5. — COUPES DE L'ŒIL ENTIER

Il est parfois nécessaire de pratiquer des coupes comprenant les milieux de l'œil maintenus dans leur situation respective. Il ne faut pas songer dans ce cas à employer une méthode simple et il est indispensable de combiner plusieurs procédés destinés à obtenir une *fixation* fidèle et un *durcissement* convenable.

1° *Fixation*. — La solution fixatrice doit être très pénétrante « car les tissus qui forment les diverses parties de l'œil ont une consistance très différente. Il y a des membranes, comme la sclérotique et la cornée qui possèdent une consistance considérable et qui sont par conséquent très peu perméables pour les liquides de fixation. Ces deux membranes, placées à la périphérie du globe oculaire entourent les autres parties de l'œil et empêchent la pénétration des liquides dans l'intérieur de l'organe et la fixation des éléments qui composent le contenu du bulbe. Il faut ramollir la sclérotique pour permettre au fixateur de passer plus rapidement au travers de cette membrane. Nous nous servons de l'*acide acétique* que nous ajoutons au liquide de fixation. Ce dernier se compose d'un mélange d'*acide chromique*, d'*acide picrique* et dans quelques cas d'*acide osmique* (1).

Sol. aq. d'acide chromique à 1 p. 100......	25 vol.
Sol. aq. saturée d'acide picrique...........	10 vol.
Eau.................................	65 vol.

Ajoutez quelques gouttes d'acide acétique.

Si l'on veut fixer les éléments de la rétine d'une façon aussi parfaite que possible il est indispensable d'ajouter à ce mélange 2 vol. d'acide osmique à 1 p. 0/0.

On place l'œil entier dans ce mélange et au bout de quatre ou cinq jours, quand le bulbe a acquis une certaine consistance, on le coupe en deux moitiés en orientant le rasoir de telle sorte que la section passe à travers le nerf optique et par le milieu de la cornée.

(1) HŒNSEL. *Bulletin de la Clinique nationale des Quinze-Vingts*, 1886.

2° *Durcissement*. — On porte les hémisphères dans l'eau où on les abandonne trois ou quatre jours pour enlever l'acide picrique et la couleur produite par l'acide picrique et par l'acide chromique. On les plonge ensuite dans le *liquide de Muller* ou dans l'*alcool*.

L'œil doit séjourner au moins deux semaines dans le *liquide de Muller*. Après quoi on le lave soigneusement et on le colore en masse avec le carmin au borax.

Si l'on choisit l'*alcool* on porte successivement la pièce dans la solution colorante, puis dans l'alcool à 40°, 60°, 80° et 90°.

3° Coloration. (En masse avec le carmin au borax.)

4° Inclusion dans la paraffine ou dans la celluloïdine.

CHAPITRE DIX-HUITIÈME

ÉTUDE DE LA KARYOKINESE

§ 1. — MÉTHODES GÉNÉRALES

Les tissus, dans lesquels on veut observer la division indirecte des noyaux, doivent être traités suivant les méthodes générales que nous avons étudiées dans la première partie de ce livre.

Ils doivent être soumis à l'action d'un réactif *fixateur*, puis *durcis* et débités en *coupes*. Ces dernières, *colorées* au moyen d'une teinture, seront observées immédiatement ou conservées dans un liquide approprié.

Nous ne reviendrions pas sur ces méthodes si elles ne devaient être modifiées pour l'étude spéciale que nous entreprenons.

1. *Fixation :* Le nombre des réactifs fixateurs applicables à l'observation du noyau en voie de division est extrêmement restreint. Nous conseillons d'employer exclusivement soit le *liquide de Flemming*, soit l'*acide picrique* en solution aqueuse.

Le *liquide de Flemming* est un mélange d'*acide chromique*, d'*acide acétique* et d'*acide osmique*. Voici deux formules indiquant, l'une, la composition de ce liquide tel qu'il a été indiqué par Flemming, l'autre (nº 2) est le liquide de Flemming employé par H. Fol.

1º	Sol. d'acide chromique à 1 p. 100...........	25
	Sol. d'acide osmique à 1 p. 100..........	10
	Sol. d'acide acétique à 1 p. 100...........	10
	Eau distillée...........................	55
2º	Sol. d'acide chromique à 1 p. 100...........	25
	Sol. d'acide osmique à 1 p. 100...........	2
	Sol. d'acide acétique à 1 p. 100...........	5
	Eau distillée......	68

Le liquide de H. Fol, moins riche en osmium, noircit moins les pièces, ce qui facilite les lavages et la coloration (Bolles Lee et Henneguy). On obtient cependant de fort belles préparations avec le liquide de Flemming, tel que l'a formulé cet auteur. On aura soin de conserver le mélange chromo-acéto-osmique dans un flacon bouché à l'émeri, et minutieusement lavé, comme il a été dit pour la conservation de l'acide osmique à 1 p. 100. Il faut avoir soin de ne placer dans ce liquide que des pièces de très petites dimensions (un millimètre de côté environ), si l'on veut obtenir une fixation complète. L'action du fixateur doit être prolongée pendant six ou douze heures.

L'*acide picrique*, en solution aqueuse saturée, fixe très bien les figures karyokinétiques. Il convient de n'employer que de très petits fragments de tissus, et il faut éviter de prolonger son action au delà de vingt quatre heures.

2. *Durcissement*. — Les pièces fixées par l'un des réactifs précédents, seront minutieusement lavées. Après le mélange chromo-acéto-osmique, on lavera pendant cinq ou six heures dans un grand cristallisoir plein d'eau ; après l'acide picrique, on emploiera pour les lavages l'alcool fort plusieurs fois renouvelé.

Après l'action du fixateur, le durcissement est suffisant pour permettre de faire des coupes suffisamment minces. Si l'on n'y parvient pas, on emploiera la gomme et l'*alcool*, mais on se gardera bien de faire une inclusion dans la paraffine ou dans la celluloïdine, comme le conseillent certains auteurs ; on obtiendrait ainsi de fort laides préparations. Ainsi, pour durcir, employer l'alcool, ou tout au plus, la *gomme* et l'*alcool*.

3. *Coupes, coloration et conservation*. — Les coupes exécutées à main libre, ou à l'aide d'un microtome quelconque, seront soumises à l'action d'un réactif colorant, qui sera choisi avec un grand soin. Le vert de méthyle, le carmin aluné, l'hématoxyline et la safranine fournissent des colorations très brillantes.

Le *vert de méthyle* ne teint que la nucléine seule ; c'est donc le colorant par excellence des figures karyokynétiques ; mais la coloration obtenue s'efface avec le temps. Voici la solution qu'il convient d'employer :

Vert de méthyle........................	1 gr.
Acide acétique........................	1 gr.
Eau distillée........................	100 gr.

Monter la coupe sur une lame et ajouter une goutte de la solution de vert de méthyle acide. Couvrir d'une lamelle et remplacer la teinture par de la glycérine acide additionnée d'un peu de vert de méthyle. La coloration s'effectue très rapidement quand les tissus ont été fixés par l'acide picrique; elle est plus lente lorsqu'on a fait usage du liquide de Flemming. Grâce à la présence de l'acide acétique, l'élection est immédiate.

Le *carmin aluné* vient après le vert de méthyle sous le rapport de son électivité pour la nucléine. Il est bon de placer les coupes dans un tube bouché renfermant une certaine quantité de la teinture et de prolonger la coloration pendant un jour. Les coupes seront lavées puis montées dans l'eau qu'on remplacera progressivement par de la glycérine additionnée d'un peu de carmin aluné.

L'*hématoxyline* de Ranvier colore les figures karyokinétiques d'une façon admirable. C'est un colorant énergique, mais les coupes se décolorent dans la glycérine. Il faut, de toute nécessité, les déshydrater et les monter dans la résine dammar en suivant le procédé ordinaire.

La *safranine* doit être employée en suivant la méthode de surcoloration et de décoloration que l'on désigne habituellement sous le nom de *méthode de Bœttcher et Hermann.*

On place les coupes pendant 24 heures dans un ou deux c. c. de la solution suivante :

Solution saturée de safranine dans l'alcool absolu.	2 c. c.
Eau distillée..............................	2 c. c.

On décolore les coupes en les lavant dans l'alcool fort, puis on les monte sur une lame. On examine au microscope et on achève la décoloration à l'aide de l'alcool absolu. Quand les noyaux seuls restent colorés on ajoute une goutte d'essence de bergamote que l'on remplace *rapidement* par une goutte de résine dammar en solution dans la benzine et on couvre d'une lamelle.

§ 2. — MÉTHODES APPLIQUÉES

Le débutant devra observer, tout d'abord, la multiplication des noyaux dans les tissus végétaux, puis, quand il aura étudié les noyaux si volumineux et si distincts des cellules végétales, il prendra des cel-

lules animales en commençant par les tissus des amphibiens (salamandre) et en terminant par les mammifères.

a. *Karyokinèse dans les cellules végétales.* — On prendra soit l'extrémité apicale de la racine d'une jeune plante (un oignon de Jacinthe placé dans l'eau depuis quelques jours convient très bien) soit l'*ovule* d'une renonculacée ou d'une plante quelconque. On fixera par le liquide de Flemming ou par l'alcool absolu et on inclura la pièce dans la celluloïdine en suivant la méthode dont nous avons parlé plus haut. Recevoir les coupes dans une soucoupe remplie d'alcool à 90° et teindre en employant la méthode de *Bœttcher et Hermann*. Conservation dans la résine dammar.

b. *Karyokinèse chez les amphibiens.* — C'est chez la Salamandre ou chez le Triton qu'on peut observer dans tout son développement, la division indirecte des noyaux.

On trouve facilement des larves de Triton ou de Salamandre dans les flaques d'eau ou dans les petits ruisseaux vers le mois de mai ou de juin. Si on ne les emploie pas immédiatement, il est nécessaire de les conserver dans un aquarium dont l'eau sera changée chaque jour ou même deux fois par jour si le vase est petit. La nourriture de ces larves, composée de petits vers aquatiques tels que le *tubifex rivulorum*, devra être très abondante sans quoi on s'exposerait à ne point trouver de figures karyokinétiques dans les tissus.

Jetez une larve vivante dans un flacon contenant quelques centimètres cubes de liquide de Flemming. Quand la larve est devenue immobile, retirez la pour fendre la paroi abdominale et replacez-la dans le fixateur. Vous favorisez ainsi la pénétration du liquide chromo-acéto-osmique. Au bout de quelques heures, cherchez dans la région thoracique les deux tubes allongés qui représentent les poumons en voie de formation. Après les avoir détachés et fendus lavez pendant vingt minutes puis étalez sur une lame la face interne étant tournée en haut. Coloration avec l'une des teintures indiquées plus haut. Conservation dans la résine dammar.

Le *mésentère* et la *vessie* de cette même larve pourront être étudiés par le même procédé. Les lamelles des *branchies* qui se montrent de chaque côté de la tête sous forme de houppes élégantes, fournissent également de fort belles préparations.

(1) BOLLES LEE et HENNEGUY. *Loco citato*.

Si l'on veut étudier la division nucléaire sur des *coupes* on suivra la méthode suivante : Si la larve est très jeune on la sort du liquide de Flemming au bout de six heures et on la lave à grande eau. Puis on colore en masse avec le *carmin aluné* (24 heures) et on lave jusqu'à ce que l'eau n'enlève plus de matière colorante. Inclusion dans la gomme et conservation des coupes dans la glycérine ou dans le dammar. Si la larve est un peu âgée on en résèque un fragment que l'on traite comme il a été dit pour les larves très jeunes avec cette différence qu'il faut intercaler entre le liquide de Flemming et le carmin aluné, un *bain d'acide picrique* destiné à enlever les sels calcaires qui ont commencé à infiltrer le système osseux. On pourrait d'ailleurs *fixer* une larve par l'*acide picrique* et faire des coupes sur les points cartilagineux du squelette, colorer par l'hématoxyline et conserver dans le baume. Ces préparations, en raison de la transparence de la substance fondamentale du cartilage, donnent les plus belles figures karyokinétiques qu'il soit possible d'observer.

S'il était impossible de se procurer une larve de salamandre ou Triton on pourrait la remplacer par un *têtard* ou par une *grenouille très jeune*. Il est facile de faire, avec cet animal, toutes les préparations que nous venons de décrire mais les résultats seront infiniment moins beaux.

Karyokinèse chez l'homme. — Un fragment de peau bien débarrassé du tissu conjonctif sous-cutané et enlevé sur une pièce provenant d'une opération pratiquée chez un sujet très jeune (encore chaud) est fixé par le liquide de Flemming ou par l'acide picrique. La pièce, qui ne doit pas mesurer plus d'un millimètre de diamètre, est retirée au bout de vingt-quatre heures, bien lavée, puis colorée en masse par le carmin aluné (vingt-quatre heures), après quoi nouveau lavage et inclusion dans la gomme. Les coupes seront conservées dans la résine dammar.

FORMULAIRE

INDIQUANT LA COMPOSITION DES PRINCIPAUX RÉACTIFS EMPLOYÉS EN HISTOLOGIE

I. — Réactifs fixateurs et durcissants.

Acide acétique. — A l'état de solution aqueuse à 0,5 ou 1 p. 100 cet acide fixe très bien les structures nucléaires. Combiné avec quelques autres substances, il est souvent employé dans l'étude de la karyokinèse (Voyez acide osmique et vert de méthyle).

Acide chromique. — Ses cristaux très hygrométriques doivent être conservés dans des flacons bouchés à l'émeri à l'abri de l'humidité et des matières organiques. Autrefois très employé, cet acide tend à être remplacé par les bichromates. On doit faire usage d'une solution très faible.

Eau distillée.........	100 gr
Acide chromique.......	0 gr 1

Si l'on veut simplement fixer on laissera le tissu dans ce mélange pendant plusieurs heures, puis on lavera soigneusement et on conservera la pièce dans l'alcool fort qu'on renouvellera autant de fois qu'il se teindra en jaune. Il est bon de tenir le bocal, contenant la préparation, à l'abri de la lumière.

Comme durcissant l'acide chromique doit être employé d'une façon méthodique si l'on veut obtenir de bons résultats. Prendre d'abord une solution faible et augmenter progressivement jusqu'à 2 et 5 p. 1000 ; employer une très grande quantité de fixateur et renouveler plusieurs fois la solution. Malgré des lavages soigneusement faits la coloration des pièces, traitées par l'acide chromique est très difficile. On emploiera de préférence les couleurs d'aniline et l'hématoxyline.

L'acide chromique entre dans la composition d'un assez grand nombre de liquides fixateurs et durcissants.

a. *Acide chromique et alcool.*

Sol. d'acide chromique..	2 vol.
Alcool.........	1 vol.

b. *Acide chromique et acide acétique.*

Acide chromique.......	0 gr 2
Acide acétique...... ...	0 gr 1
Eau distillée...........	100

c. *Liquide de Flemming* (nouveau mélange).

Sol. Acide chromique à 1 p. 100...	15 parties
Sol. Acide osmique à 1 p. 100.......	4
Sol. Acide acétique à 1 p. 100.......	1

d. *Liquide de Fol.*

Sol. Acide chromique 1 p. 100........ 25 parties
Sol. Acide osmique 1 p. 100........ 2
Sol. Acide acétique 1 p. 100........ 5
Eau distillée....... 67

ACIDE FORMIQUE. — L'acide formique possède des propriétés semblables à celles de l'acide acétique. On l'emploie pour le même usage et dans les mêmes conditions que cet acide.

ACIDE NITRIQUE. — Fixateur d'une grande finesse à condition de ne pas le faire agir trop longtemps. On emploie les solutions suivantes :

a. Acide nitrique pur.. 3 à 10
Eau distillée........... 100

b. *Acide chromique, acide nitrique et alcool.*

Acide nitrique à 10 p. 0/0. 30 c.c.
Ac. chromique à 0,5 p. 0/0 40
Alcool à 90°........... 30

Il est encore combiné avec l'acide picrique (voy. solution d'acide picrique).

Acide osmique. — C'est un fixateur remarquable sur lequel nous nous sommes longuement étendus au chapitre des fixations. Voici les formules des liquides fixateurs dont fait partie ce réactif.

a. Acide osmique...... 1
Eau distillée............. 100

b. *Liquide de Flemming* (voir Acide chromique).

c. *Acide osmique et alcool.*

Sol. acide osmique à 1 0/0 5 gr.
Alcool à 90°........... 5 gr.

Ce mélange ne se conserve pas il faut le faire au moment de s'en servir.

ACIDE PICRIQUE.

a. Eau.............. 1000
Acide picrique. Q.S.p. saturer.

b. *Liquide de Kleinemberg.*

Solution saturée d'acide picrique........ 100 vol.
Acide sulfurique..... 3 vol.

Il se forme un précipité. On filtre et on ajoute 3 vol. d'eau.

c. *Liquide picro-nitrique.*

Eau................ 100 vol.
Acide nitrique....... 5
Acide picrique. Q.S.p. saturer.

d. *Liquide picro-chlorhydrique.*

Eau................ 100
Acide chlorhydrique.. 8 vol.
Acide picrique. Q.S.p. saturer.

Ces deux dernières solutions doivent être employées sans ajouter de l'eau (Paul Mayer).

e. *Liq. de Kleinemberg et acide osmique.*

Liq. de Kleinemberg..... 100
Sol. d'acide osmique à 1 0/0. 100

Remplace le liquide de Flemming dans les recherches karyokynétiques (Francotte).

f. *Acide picro-chromique.*

Sol. Acide picrique saturée. 15
Sol. Acide chromique 1 0/0 26
Eau..................... 60

ALCOOL. — Employé à différentes concentrations.

a. *Alcool au tiers* (Ranvier).

Alcool à 36° Cartier..... 1 vol.
Eau distillée........... 2 vol.

Cet alcool pèse 33°,3 de l'alcoomètre centésimal. Il fixe convenablement les tissus mais il est surtout employé comme dissociateur.

b. *Alcool* à 90°. Employé couramment comme fixateur. Les tissus doivent séjourner 24 heu-

res dans ce réactif. Il sert pour coaguler la gomme dans le procédé de l'inclusion par la gomme. Les tissus gommés doivent séjourner 24-48 heures dans ce liquide suivant la grosseur.

c. *Alcool absolu.* On trouvera, dans le courant de notre livre, la manière de conserver et de préparer cet alcool. Sert comme fixateur et comme déshydratant dans le procédé de conservation des coupes dans la résine dammar. Employé comme fixateur il doit n'agir que quelques heures, dans le cas contraire il rôtit les pièces.

d. *Alcool acide de P. Mayer.*

Alcool à 90°..........	97 vol.
Acide chlorhydrique ...	3
Acide picrique.	Quelques gr.

Cet alcool ne se conservant pas doit être préparé au moment d'en faire usage. Employé comme fixateur des animaux marins et comme liquide conservateur des pièces anatomiques volumineuses. Ne laisser agir que le temps nécessaire pour assurer la pénétration du fixateur. Laver ensuite dans l'alcool à 90° jusqu'à disparition de l'acide.

BICHROMATES. — On utilise comme fixateurs et comme durcissant les bichromates de potasse ou d'ammoniaque.

a. Bichromate de potasse ou d'ammoniaque 2-4
Eau................. 100 gr.

b. *Liquide de Muller.*

Bichromate de potasse.	2 gr.
Sulfate de soude......	1
Eau.................	100

c. *Liquide d'Erlicki.*

Bichromate de potasse.	2 gr.
Sulfate de cuivre....	0 gr. 50
Eau.................	100

L'action et les usages de ces liquides ont été longuement étudiés dans le cours de ce livre.

Bichlorure de mercure. Ce sel fait partie d'un assez grand nombre de liquides fixateurs.

a. Solution aqueuse de sublimé.

Eau distillée	100 gr.
Sublimé..	Q. S. p. saturer.

Laisser les pièces dans ce liquide jusqu'à ce qu'elles soient entièrement blanches (quelques heures) Laver à l'alcool jusqu'à disparition de toutes traces du sel de mercure.

b. *Liquide mercurique acide* (Carnoy).

Eau distillée.........	100 gr.
Sublimé.............	5
Acide acétique.......	5

c. *Liquide mercurique alcalin.* (Carnoy).

Eau distillée.........	100 gr.
Chlorure de sodium...	3
Sublimé.............	5

d. *Liquide de Lang.*

Eau distillée........	100 gr
Chlorure de sodium..	5 gr 10
Acide acétique	5 gr 8
Sublimé............	3 gr 12

e. *Liquide de Lang* (2e formule).

Liquide de Kleinemberg.	100 gr.
Acide acétique.........	5
Sublimé..	Q. S. p. saturer.

Ces différents liquides mercuriques sont très utiles pour l'étude des animaux invertébrés. Sitôt que le liquide a pénétré, enlever la pièce et la laver soigneusement dans l'alcool à 90° C.

CHLORURE D'OR. — Peu employé comme fixateur. On fait usage de la solution suivante :

Chlorure d'or....	0 gr 5 à 1 gr.
Eau distillée....	100

Chlorure de platine. — Ce sel est surtout employé combiné avec l'acide chromique sous le nom de solution de Merkel.

Solution de Merkel.

Chlorure de platine sec...	0 gr 1
Acide chromique........	0 » 1
Eau distillée...........	80 gr.

Cette solution fixe très bien les structures délicates. Faire agir quelques heures puis transporter dans l'alcool à 70° C.

Perchlorure de fer. — Peu employé, il pénètre lentement mais il tue et fixe très bien les animaux unicellulaires.

Alcool ou eau distillée...	100 gr.
Teinture officinale de perchlorure.............	2-10

Pour fixer les pièces, employer la liqueur à l'alcool et laver soigneusement dans l'alcool ou dans l'eau contenant 1 p. 100 d'acide oxalique.

Iode. — Bon fixateur pour l'examen rapide des éléments.

a. *Formule de Ranvier.*

Eau distillée..........	100 gr.
Iodure de potassium....	2 »
Iode.........	Q. S. p. saturer.

b. *Formule de Lugol.*

Eau distillée..........	100 gr.
Iodure de potassium....	6 »
Iode..................	4 »

Le sérum iodé, que nous retrouverons plus loin, doit son action fixatrice à l'iode qu'il contient.

Nitrate d'argent. — Employé plus souvent pour l'imprégnation des épithéliums.

Eau distillée............	500 gr.
Nitrate d'argent........	1 »

Conserver à l'abri de la poussière dans un flacon noir.

II. — Réactifs colorants.

Carmin. — Il existe un nombre considérable de teintures ayant pour base le carmin, nous donnerons les formules d'un certain nombre bien que nous engagions nos lecteurs à n'employer que celles que nous avons données dans le courant de ce livre.

a. *Acide carminique.* — Pour extraire l'acide carminique de la cochenille, on épuise la cochenille par l'éther qui dissout les matières grasses, puis on en fait une décoction avec de l'eau bouillante. On précipite cette solution par une solution de sous-acétate de plomb rendue acide par l'addition d'acide acétique. Le précipité formé par du carminate et par du phosphate de plomb est lavé, à l'eau chaude, jusqu'à ce que l'eau de lavage ne donne plus de précipité quand on ajoute du chlorure de mercure. On décompose ensuite le carminate de plomb, tenu en suspension dans l'eau, par un courant d'hydrogène sulfuré. On décante et on évapore à sec. Le résidu est, ensuite, repris par l'alcool absolu qui donne, par évaporation, des cristaux d'acide carminique. Cet acide très soluble dans l'eau et dans l'alcool peut être employé en solution alcoolique ou en solution aqueuse,

Eau ou alcool à 90°..	100 gr.
Acide carminique....	0 gr 3

Carmin acétique. — Nous donnerons deux formules de carmin-acétique.

a. *Acétate de carmin.* — Faites bouillir de l'acide acétique à 45 p. 0/0 de concentration avec un excès de carmin. Filtrer, étendre d'eau. Une goutte de cette solution pour colorer les noyaux. Les préparations ne se gardent pas.

b. *Carmin acétique.* — (Sweiger-Seidel.) Ajouter, à une solution ammoniacale de carmin, de l'acide acétique jusqu'à formation d'un léger précipité. Filtrer. Conserver les préparations, colorées par ce carmin, dans la glycérine acide.

Carmins alcooliques. — Il en existe un grand nombre.

a. *Carmins alcooliques à l'acide chlorhydrique* (Grenacher).

Alcool à 70°........ 100 gr.
Acide chlorhydrique. 6 gouttes
Carmin............ Q. S.

Faire bouillir et filtrer.

b. *Carmin à l'acide chlorhydrique* (Mayer).

Alcool à 80°........ 100
Acide chlorhydrique. 3 gouttes
Carmin........... Q. S. p. saturer.

c. *Autre formule de P. Mayer.*

Alcool à 80°........ 100 gr.
Acide chlorhydrique. 3 gouttes
Carmin............ 4 gr.

Faire bouillir une demi-heure, filtrer à chaud et neutraliser avec de l'ammoniaque.

d. *Carmin borique alcoolique* (Francotte).

Alcool à 90°.......... 75 c.c.
Eau distillée......... 25
Acide borique........ 5
Carmin .... 0 gr 5

Faire bouillir un quart d'heure et filtrer.

e. *Carmin alcoolique au borax.* La préparation de cette teinture a été indiquée dans le courant de ce livre.

Carmin a l'alun.

a. *Carmin aluné de Grenacher.*

Eau distillée....... 100 gr.
Alun de potasse ou d'ammoniaque.... 1 à 5 gr.
Carmin..... Q. S. p. saturer.

Faites bouillir 20 minutes et filtrez. Conservez avec un cristal de thymol.

b. *Carmin aluné à l'acide acétique* (Henneguy).

Carmin à l'alun de potasse.............. 100 gr.
Acide acétique....... 10

Laissez reposer plusieurs jours et filtrez.

Carmin a l'ammoniaque.

a. *Carminate d'ammoniaque* (Ranvier).

Eau distillée........... 100
Ammoniaque........... 1 gr.
Carmin 1

Triturer le carmin dans un mortier avec l'ammoniaque jusqu'à dissolution. Ajouter l'eau. Abandonner jusqu'à disparition de l'odeur ammoniacale ou bien chauffer au bain-marie jusqu'à commencement de précipité.

b. *Carmin de Frey.*

Ammoniaque......... Q. s.
Eau distillée......... 30
Carmin.............. 0,30
Glycérine............ 30 gr.
Alcool.... 4

Dissoudre le carmin dans l'ammoniaque. Quand l'odeur ammoniacale a disparu ajouter la glycérine et l'alcool.

c. *Carmin de Hoyer.*

Carmin............ 1 gr.
Ammoniaque........ 1-2 c.c.
Eau distillée........ 10 c.c.

Après avoir fait chauffer au bain-marie jusqu'à disparition de l'excès d'ammoniaque, filtrer et ajouter de l'eau distillée pour former 100 c. c. Il est indispensable

d'ajouter un gramme de chloral. On peut encore conserver le carmin en *pâte*, en *poudre*. Après avoir filtré (avant ajouter l'eau) on précipite la solution par l'addition de 50 grammes d'alcool à 90°. Filtrer de nouveau. Le précipité est lavé puis séché pour l'avoir en poudre. Si on veut le conserver à l'état de pâte, triturer ce précipité avec 2 c. c. d'alcool, 2 c.c. de glycérine et 1 gr. de chloral (Francotte). Pour faire la solution colorante dissoudre 1 gr. de poudre ou de pâte dans l'eau distillée.

d. *Carmin de Beale.*

Carmin	0 gr 64
Ammoniaque	3 gr 5
Eau distillée	60 gr.
Glycérine	60
Alcool	15

Triturer le carmin dans un mortier avec l'ammoniaque jusqu'à dissolution. Ajouter l'eau et laisser évaporer l'excès d'ammoniaque. Ajouter ensuite la glycérine et l'alcool. Ce carmin donne des colorations diffuses; pour avoir l'élection il faut laver les coupes, apres teinture, dans l'alcool au tiers contenant quelques gouttes d'acide chlorhydrique (Francotte).

Carmins a l'acide picrique.

Picro-carmin (Ranvier). En outre des deux formules que nous avons donné page 44, il existe de nombreux procédés pour la fabrication du picro-carmin.

1. *Méthode de Gage.*

Carmin	1 gr.
Ammoniaque	50
Acide picrique solut. à 1 p. 0/0	100

Dissoudre le carmin dans l'ammoniaque et ajouter l'acide picrique les solutions étant froides. Evaporer à sec et dissoudre le résidu dans 100 gr. d'eau.

2. *Méthode de Weigert.*

Carmin	2 gr.
Ammoniaque	4
Solution sat. d'acide picrique	200

Dissoudre le carmin dans l'ammoniaque et ajouter l'acide picrique après 24 heures de repos. Verser dans la solution de l'acide acétique jusqu'à ce qu'il se produise un léger précipité. Laisser reposer 24 heures, filtrer et, si le liquide n'est pas clair, ajouter quelques gouttes d'ammoniaque.

3. *Méthode de Hoyer.*

Carmin de Hoyer en poudre	1 gr.
Sol. conc. de picrate d'ammoniaque	100

4. *Méthode de Pergens* (Carnoy).

Carmin (en excès).	
Ammoniaque	1 vol.
Eau	4

Après 48 heures, filtrer et laisser à l'air jusqu'à formation d'un léger précipité. Filtrer de nouveau et ajouter une solution saturée d'acide picrique. Au bout de 24 heures filtrer de nouveau et ajouter 1 gr. de chloral par litre.

5. *Méthode de Bizzozero.*

1re solution.

Carmin	0,50
Ammoniaque	3 gr.
Eau	50

Faire dissoudre le carmin dans l'ammoniaque et ajouter l'eau.

2e solution.

Eau	50 gr.
Acide picrique	0,5

Verser la 2e solution dans la première en agitant vivement. Evaporer jusqu'à disparition de l'odeur ammoniacale, ajouter 10 c. c. d'alcool et filtrer.

6. *Méthode d'Arcangeli.*

Sol. aqueuse sat. d'acide picrique	50 gr.
Carmin	0,25

Faire bouillir dix minutes et filtrer.

CARMIN AU BORAX.

Borax	4 gr.
Eau distillée	100
Carmin	1

Faire bouillir et filtrer. Après coloration laver dans l'alcool acidulé par Hcl.

Carmin à l'acide borique (aqueux).

Acide borique	4 gr.
Eau distillée	100
Carmin	0,5

Faire bouillir dix minutes, filtrer.

Laver, après coloration, d'abord dans l'eau puis dans l'alcool.

CARMIN AU LITHIUM (Orth).

Solution saturée de carbonate de lithine	97 gr.
Carmin	2,5

Faire bouillir jusqu'à dissolution et filtrer. Après coloration laver les coupes dans l'alcool à 70° contenant 1 p. 0/0 de Hcl.

CARMIN OXALIQUE (Thiersch).

1re solution.

Carmin	1 gr.
Ammoniaque	1
Eau	3

Dissoudre le carmin dans l'ammoniaque et ajouter l'eau.

2e solution.

Acide oxalique	1 gr.
Eau	22

Ajouter 1 gr. de la première solution à 8 gr. de la seconde et additionner de 12 gr. alcool absolu.

CARMIN SALICYLIQUE ET ALUNÉ

Sol. sat. d'alun	100 gr.
Acide salicylique	0,25
Carmin	0,25

Faire bouillir jusqu'à dissolution et filtrer.

COCHENILLE. — Nous indiquerons deux formules de teinture à la cochenille.

a. *Solution aqueuse.*

Cochenille pulvérisée	7 gr.
Alun pulvérisé	7
Eau	700

Faire bouillir jusqu'à réduction à 400 gr. Ajouter de l'acide phéque.

b. *Solution alcoolique.*

Alcool a 70°	10 c. c.
Cochenille	1 gr.

Colorer, avec ce réactif pur ou dilué, les coupes sortant de l'alcool à 70°.

CARMIN D'INDIGO. — Ce colorant est combiné avec une autre teinture pour produire une double coloration.

1re solution.

Carmin	0,88
Borax	3,54
Eau distillée	95

Faire bouillir jusqu'à dissolution et filtrer.

2e solution.

Carmin d'indigo	4 gr.
Eau distillée	64
Borax	4

Faire bouillir et filtrer. Mélanger parties égales de la 1re et de la 2e solution. C'est après fixation par l'acide chromique que cette teinture donne les meilleurs résultats. Après coloration laver les coupes dans une solution sa-

turée d'acide oxalique puis dans l'eau. Monter au baume en suivant la technique ordinaire.

Autre formule.

Sol. saturée de carmin d'indigo............... 1 goutte
Alcool à 95°......... 30 gr.

Colorer les coupes avec le carmin aluné, laver soigneusement, colorer de nouveau avec le earmin d'indigo.

COULEURS D'ANILINE. — Règle générale les couleurs d'aniline doivent être conservées en solution concentrée dans l'alcool absolu. Ajouter 1 c. c. de solution à 100 c. e. d'eau ou d'alcool suivant que la couleur est soluble ou insoluble dans l'eau.

Bleu de méthylène. — Couleur soluble dans l'eau et dans l'alcool ; très employée pour la coloration des microbes elle peut également servir pour produire une coloration double.

Formule du Dr Sahli.

Une coupe de moelle durcie par le bichromate est placée pendant quelques heures dans la solution suivante :

Eau distillée.......... 30 gr.
Bleu de méthylène..... Q. S p. saturer.

Lorsqu'elle a pris une teinte bleu foncé on la lave dans l'eau puis on la porte dans la deuxième teinture formée de :

Eau distillée............ 30 gr.
Fuchsine acide. Q. S. p. saturer.

Après cinq minutes on lave rapidement dans :

Alcool................. 50 gr.
Potasse caustique....... 0,50

puis on lave dans une grande quantité d'eau et on monte au baume en suivant la technique habituelle.

Bleu d'aniline. — Il existe plusieurs variétés de bleu d'aniline.

Le bleu d'aniline insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool, a été employé par Ranvier pour la coloration des coupes d'os et par M. Duval pour la coloration des coupes du système nerveux central. Les eoupes, colorées avec le carmin et déshydratées par l'alcool absolu, sont placées pendant un quart d'heure dans la teinture suivante :

Sol. sat. de bleu d'aniline dans l'alcool absolu.... X gouttes
Alcool absolu...... 10 gr.

Au sortir de ce bain, éclaircir avec l'essence de bergamote et monter dans la résine.

Bleu de Lyon. — Pour double coloration, après teinture par le carmin aluné. La coupe lavée et déshydratée par l'alcool absolu, est placée pendant quelques minutes dans la solution de bleu.

Bleu de Lyon....... 1 gr.
Alcool absolu....... 100

Eclaircir et monter au baume.

Bleu de Quinoléine. — Ce bleu, bien que soluble dans l'eau, doit être conservé en solution dans l'alcool absolu. Au moment d'en faire usage, verser quelques gouttes de la solution saturée dans une soucoupe remplie d'eau filtrée.

Brun de Bismark. — Couleur plus soluble dans l'alcool que dans l'eau. On peut faire usage, soit de la solution alcoolique, soit de la solution aqueuse.

1re solution.

Aleool à 70°.......... 100
Brun de Bismark...... Q. S. p. saturer.

2e solution.

Eau distillée........ 200 gr.
Brun de Bismark.... 1

Faire bouillir et filtrer au moment de s'en servir.

Eosine. — Vous trouverez, page 48 la manière d'employer l'éosine à l'eau et l'éosine à l'alcool. Voici quelques formules pour les colorations combinées.

1. *Méthode de Lang.*

Picro-carmin	50 gr.
Eau distillée..........	50
Eosine	1

Colorer pendant deux jours, et laver dans l'alcool pour enlever l'acide picrique.

2. *Éosine et vert de méthyle.*

1re solution.

Éosine (solut. à 1 p. 200)	1 c.c.
Alcool absolu..........	3

Colorer les coupes dans ce liquide pendant quelques minutes, laver et teindre par :

Vert de méthyle.........	1
Eau distillée............	200

Laver et monter au baume.

Fuchsine. — Soluble dans l'eau ou dans l'alcool. Colore d'une façon diffuse et énergique.

Nigrosine. — Couleur soluble dans l'eau et dans l'alcool.

Eau....................	100
Nigrosine..............	1

Filtrer.

On peut encore employer la solution de picro-nigrosine.

Sol. sat. d'acide picrique (alcool)...........	100
Nigrosine....	Q. S. p. saturer,

SAFRANINE. — Soluble dans l'eau et dans l'alcool.

Safranine............	0,10
Alcool absolu....... ..	10 gr.
Eau distillée..........	20

Faire dissoudre la safranine dans l'alcool absolu et ajouter l'eau au bout de quelques jours de repos. Filtrer.

Ce colorant sert encore dans un certain nombre de colorations multiples.

Méthode de Brun.

1re solution.

Bleu de Prusse soluble...	1 gr.
Acide oxalique.........	0,25

Faire dissoudre dans très peu d'eau puis ajouter 100 c. c. d'eau distillée. Filtrer.

2e solution.

Alcool.........	10 gr.
Safranine.............	0.50
Alun..................	0,50
Eau..................	100

Faire dissoudre la safranine dans l'alcool et ajouter l'eau alunée.

Les objets restent dans la première solution 10 minutes. Laver et colorer pendant quelques minutes avec la safranine.

Méthode de Garbini.

Bleu d'aniline (sol. saturée)............	1 c. c.
Eau distillée........	100 c. c.

Colorer deux minutes dans cette teinture, puis laver dans :

Ammoniaque	1 gr.
Eau distillée.........	100

Jusqu'à décoloration presque complète.

Laver de nouveau dans :

Acide chlorhydrique..	1 gr.
Eau distillée.........	200

puis dans l'eau distillée. Colorer ensuite pendant quelques minutes dans la solution de safranine :

Alcool au tiers.......	200 gr.
Safranine	1

Monter dans la résine en suivant la technique ordinaire.

VERT DE MÉTHYLE. — Soluble dans l'eau et dans l'alcool,

c'est une teinture excellente pour colorer la chromatine.

Vert de méthyle. . . . . 2 gr.
Eau distillée 100
Acide acétique. 1

Examiner dans le liquide de coloration ou dans la glycérine acide légèrement teintée en vert.

On peut encore faire usage de la solution suivante :

Glycérine. . . . . 100 gr.
Vert de méthyle. 1
Acide acétique. 1

VIOLET. — Colorant diffus. Soluble dans l'alcool et dans l'eau. On peut faire usage de la solution à 1 p. 100.

Violet 5 B (Sol. sat. dans l'alcool). 100
Eau distillée. . . . . 1 c. c.

DAHLIA. — Soluble dans l'eau et dans l'alcool.

VIOLET DE GENTIANE. — Soluble dans l'eau et dans l'alcool.

HÉMATOXYLINE.

a. *Formule de Boehmer.*

1re solution.
Hématoxyline. 0,35
Alcool absolu. . . . . 10 gr.

2e solution.
Eau distillée. . . . . 30 gr.
Alun de potasse. 0,10

Versez quelques gouttes de la première solution dans la seconde. Laisser au repos quelques jours, avant d'en faire usage.

b. *Succédané de l'hématoxyline* (Francotte).

Extrait de campêche pulvérisé . . . . 5 gr.
Alcool absolu. 30

Faire macérer plusieurs jours et ajouter quelques gouttes de cette teinture à une solution d'alun à 1 0/0.

c. *Hématoxyline de Ranvier* (voyez page 47).

d. *Hématoxyline de Weigert.*

e. *Glycérine hématoxylique* (Erlich).

Eau distillée. . . . . 50 gr.
Alcool absolu. 50
Glycérine. 50
Acide acétique. 5
Hématoxyline 1
Alun. . . . . en excès.

Ce mélange doit rester longtemps exposé à l'air et à la lumière avant de servir.

f. *Hématoxyline de Kleinemberg.*

Alcool à 70°. . . . . 30 gr.
Alun. . . . . Q. S. p. saturer.
Chlorure de calcium Q. s. pour saturer.

Filtrer et ajouter 180 c. c. d'alcool à 70°. Au moment de s'en servir, ajoutez à une certaine quantité de ce liquide quelques gouttes d'alcool absolu saturé d'hématoxyline ; on teint les coupes au sortir de l'alcool. S'il y a surcoloration on décolore par

Alcool. . . . . 100 gr.
Acide chlorhydrique. . . . 0,5

Monter au baume.

Hématoxyline de Grenacher.

Solution sat. d'alun d'ammoniaque. . . . . 100 gr.
Solution saturée d'hématoxyline dans l'alcool. . . 4 gr.

Exposer à l'air et à la lumière pendant huit jours et ajouter.

Alcool méthylique. . . . . 25 c. c.
Glycérine. 25

Glycérine à l'hématoxyline et à l'éosine (Renaut).

Sol. sat. d'alun de pot. dans la glycérine. . . . 130 c. c.

Sol. sat. d'éosine dans l'eau .... 30 c. c.
Hématoxyline sol. sat. dans l'alcool 40

Mélanger et abandonner à l'air pendant deux mois. Filtrer. Les préparations se conservent bien dans une goutte du colorant additionné de 2 vol. de glycérine.

IMPRÉGNATIONS. — On se sert du nitrate d'argent, du chlorure d'or et plus rarement des sels de fer ou autres métaux.

a. *Nitrate d'argent.*

Nitrate d'argent.... 1 gr.
Eau distillée....... 100-500

b. *Chlorure d'or.*

c. *Bleu de Prusse.*

Sulfate de fer.......... 0.5
Eau distillée........... 100 gr.

Laisser quelques minutes dans ce bain puis porter dans

Cyanure jaune de potassium .... 1 gr.
Eau distillée........... 100

d. *Perchlorure de fer.*

Perchlorure de fer..... 2 gr.
Eau dist. ou alcool...... 0)

Lorsque les tissus sont imbibés réduire dans

Alcool ou eau.......... 100 gr.
Acide pyrogallique.. .. 2

PURPURINE. — Soluble dans les solutions saturées d'alun.

a. *Purpurine de Ranvier.*

Alun.. .... 1 gr.
Eau distillée.... . . 100 gr.
Purpurine..... ... .. excès.

Faire bouillir, filtrer et ajouter 60 gr. d'alcool à 36° Cartier. Cette solution ne se conserve pas longtemps.

b. *Purpurine à la glycérine.*

Glycérine saturée d'alun.. 100
Purpurine............ .... excès

Faire bouillir, filtrer. On peut ajouter un peu d'eau si la glycérine est trop dense pour faciliter l'ébullition.

III. — Formules d'inclusion.

On trouvera les formules des inclusions dans la gomme, dans la paraffine et dans le collodion, dans le cours de ce livre (p. 31).

a. *Inclusion dans la gélatine* (Kaiser).

Eau distillée.. 60
Glycérine................ 60
Gélatine................. 10
Acide phénique........... 1

Faire dissoudre la gélatine dans l'eau en chauffant au bain-marie. Ajouter la glycérine et l'acide phénique, chauffer encore dix minutes et filtrer sur la flanelle.

Quand on veut inclure une pièce, on la place alors quelle est déjà fixée, durcie et bien imbibée d'eau, dans une petite quantité de ce mélange maintenu liquide par une douce chaleur. La durée de l'imbibition varie de quelques heures à un jour. Après quoi on durcit par l'alcool à 90° et on coupe avec un rasoir mouillé d'alcool.

b. *Inclusion dans le savon.*

Savon blanc sec et pulvérisé. 10
Alcool à 95°............. 35
Glycérine................ 20

Chauffer jusqu'à dissolution. La pièce est placée, au sortir de l'alcool, dans une solution formée de parties égales du mélange de savon et d'alcool, puis dans le mélange de savon pur. On chauffe au bain-marie à 55° pour maintenir la masse liquide. Couper à sec et enlever le savon avec l'eau alcoolisée.

IV. — Liquides pour fixer les coupes sur le porte-objet.

1. *Albumine de Mayer.*

Prendre un blanc d'œuf auquel on ajoute un peu de salicylate de soude et filtrer sur un filtre mouillé. Au liquide clair ajouter un volume de glycérine et encore un peu de salicylate. Au moment de ranger les coupes étendre avec un pinceau une couche très mince de ce mélange sur un porte-objet. Lorsque les coupes sont placées, coaguler l'albumine, par une douce chaleur. Convient pour les coupes sortant d'un bain d'eau.

2. *Gomme-Laque.*

Gomme-laque blanche..	1 gr.
Alcool absolu..........	10

Filtrer après avoir laissé déposer.

A l'aide d'un pinceau étendre une couche très mince de cette solution sur un porte-objet. Laissez sécher. Humecter la gomme laque avec de l'essence de girofle. ranger les coupes, évaporer l'essence en chauffant à 55° ; dissoudre la paraffine par l'essence de térébenthine. Cette méthode s'applique exclusivement aux coupes obtenues par inclusion dans la paraffine.

3. *Gomme arabique.*

Eau..................	50 gr.
Gomme arabique.......	2,50
Acide phénique........	0,50

Etendre cette solution sur un porte-objet, faire écouler l'excès en inclinant le porte-objet et laisser sécher, à l'abri de la poussière. Humecter la couche en projetant l'haleine ; ranger les coupes ; laisser sécher et dissoudre la paraffine par l'essence de térébenthine. Applicable après l'inclusion à la paraffine.

4. *Gomme arabique et alun.*

Solution claire de gomme dans l'eau...............	100 gr.
Alun de chrome, q. indéterminée.	
Glycérine............	1 c. c.

Enduire la lame avec cette solution, ranger des coupes ; chauffer à 30° pendant 10 minutes pour rendre la gomme insoluble.

5. *Gutta-percha* (Frenzel).

Chloroforme ou benzine	100 gr.
Gutta-percha.........	2

Laisser déposer (15 ou 20 jours décanter ou filtrer. Etendre ce liquide en couche mince sur les lames, laisser sécher ; ranger les coupes et chauffer (10 minutes) à 50°. Dissoudre la paraffine par l'essence de pétrole.

V. — Liquides conservateurs.

1. *Acétate de potassium.*

Eau distillée..........	50 gr.
Acétate de potassium, Q. s. p. saturer.	

Une goutte sur le bord de la lamelle, fermer au bout de 36 heures.

2. *Acide phénique* (voir p. 50) en outre :

Sirop simple........	50 gr.
Acide phénique.	0,50

1. *Liquides au bichlorure de mercure.*

a. *Liquide de Pacini.*

Sublimé..............	1 gr.
Chlorure de sodium.....	2
Glycérine.............	13
Eau distillée...........	113

Après un mois de repos, filtrer et faire le liquide conservateur suivant :

Mélange indiqué plus haut 1 gr.
Eau distillée........... 3

b. *Autre liquide.*

Sublimé........... ... 1 gr.
Acide acétique......... 2
Glycérine.............. 13
Eau distillée..........115

S'emploie comme le précédent.

d. *Liquide de Gilson*

Sublimé............. 0 gr 15
Acide acétique (sol. à 15 p. 100 .... 2 c. c.
Glycérine............. 30 gr.
Alcool à 60°........... 60
Eau distillée 33

e. *Liquide de Gage.*

Sublimé 0,25
Chlorure de sodium... 2 gr.
Blanc d'œuf.......... 8
Eau distillée.......... 100

Sirop au chloral.

Sirop simple.......... 50 gr.
Chloral hydraté....... 0,25

Créosote.

Eau distillée....... . 100
Créosote............ 1 à 5

GÉLATINES GLYCÉRINÉES

Formule de Legros.

1re solution.
Eau distillée........ . 20 gr.
Gélatine............. 10

2e solution.
Eau distillée......... 30
Acide arsénieux, q. s. p. saturer.

Mélanger la 2e solution à la première en chauffant à 35° environ. Ajouter quelques gouttes d'acide phénique.

Formule de Fol.

Gélatine............... 30 gr.
Eau distillée........... 70
Glycérine... .... 100 gr.
Acool camphré........ 5

Dissoudre la gélatine dans l'eau ajouter la glycérine, puis l'alcool camphré. Filtrer sur de la flanelle.

Glucose (Brun).

Eau distillée......... 140 gr.
Alcool camphré....... 10
Glucose............ . 40
Glycérine........... 10

Dissoudre le glucose dans l'eau ajouter la glycérine puis le camphre. Filtrer.

GLYCÉRINE. — Acide ; au picrocarmin ; acide et picriquée (v. page 51).

1. *Glycérine-chloral.*

Glycérine............ 50 gr.
Hydrate de chloral, q.s.p. saturer.

Plus réfringent que la glycérine pure.

2. *Glycérine-alcool.*

Glycérine.............. 1 gr.
Eau.................. 2
Alcool................. 1

Moins réfringent.

3. *Glycérine extra-réfringente.*

Glycérine................ 50
Sulfocarbonate de zinc..... 50

Faire bouillir une heure, filtrer à chaud.

GOMME.

a. *Liquide de Frey.*

Sol. sat. d'acide arsénieux.............. 20 gr.
Glycérine............ 20
Gomme arabique...... 20

b. *Liquide de Hoyer.*

Sol. off. d'acétate de potasse............ 100 gr.
Gomme........Q. S. p. saturer

RÉSINES.

1. *Baume du Canada.*

Chloroforme, xylol ou benzine .... 50 gr.
Baume du Canada sec.... Q. S. pour avoir une solution limpide après repos.

2. *Résine dammar* (même formule).

3. *Baume et résine.*

Sol. de baume dans la benzine............... 20 gr.
Sol. de dammar dans la benzine .... 20 gr.

4. *Liq. de Rippart et Petit.*

Chlorure de cuivre..... 0,30
Acétate de cuivre...... 0,30
Acide acétique......... 1 gr.
Eau camphrée......... 60
Eau distillée.. 90
Filtrer.

VI. — Liquides dissociateurs et décalcifiants.

Acide chromique.

Eau................. 500 gr.
Acide chromique..... 0,5
Dissociateur.

Acide osmique.

Sol. à 1 p. 0/0........ 1 c.c.
Eau distillée.......... 10 c.c.
Dissociateur.

Acide azotique.

Eau distillée.......... 50 gr.
Acide azotique......... 15
Dissociateur.

Sérum artificiel de Frey.

Blanc d'œuf........... 30
Sel marin 0,4
Eau................... 270
Iode. Q. S. p. conserver le mélange.

Acide nitrique (décalcifiant).

Eau.................. 100 gr.
Acide nitrique........ 1-2

Acide chlorhydrique et chromique (décalcifiant).

Eau................. 100 gr.
Acide chlorhydrique. 0,50
Acide chromique.... 2 gr.

Acide picrique (décalcifiant).

Eau................. 100 gr.
Acide picrique. Q. S. p. saturer.

Acide picro-nitrique (décalcifiant).

Sol. sat. d'acide picrique 100 gr.
Acide nitrique......... 2

TABLE DES MATIÈRES

PREMIÈRE PARTIE

Le Microscope et les annexes du Microscope.

DEUXIÈME PARTIE

Méthodes générales.

TROISIÈME PARTIE

Technique appliquée.

HAVRE. — IMPRIMERIE DU COMMERCE, 3, RUE DE LA BOURSE.

